

Zur Struktur und Funktion des mitochondrialen Genomes
von Saccharomyces cerevisiae

Gabriele Grosch

—

1979
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0064

Druck und Verlag: Arbeitsgruppe Psychologie
Plantscherweg 22
8000 München 60

Zur Struktur und Funktion des mitochondrialen Genomes
von Saccharomyces cerevisiae

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Gabriele Grosch
aus Dortmund
April 1980



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
 2. Berichterstatter: Priv. Doz. R.J. Schweyen
- Tag der mündlichen Prüfung 11.12.1979

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1 - 4
Material und Methoden	5 - 24
1. Stämme	5
2. Medien	5
3. Chemikalien	6
4. Abkürzungen	7
5. Methoden	9
5.1. Züchtung von Hefezellen	9
5.2. Isolierung von Nukleinsäuren aus Hefemitochondrien .	9
5.2.1. Isolierung der Mitochondrien	9
5.2.2. Lyse von Mitochondrien für Gradienten	10
5.2.3. Lyse von Mitochondrien für die Gelelektrophorese .	10
5.2.4. Extraktion von Proteinen	10
5.3. Isolierung von Nukleinsäuren aus Hefeprotoplasten .	11
5.4. Isolierung der mitochondrialen DNS durch Dichte- zentrifugation	12
5.4.1. NaJ-Dichtegradienten	12
5.4.2. CsCl-Dichtegradienten	12
5.5. Reinigen der Mitochondrien-DNS nach dem Dichte- gradienten	13
5.5.1. Entfernen des Ethidiumbromids und des NaJ	13
5.5.2. Entfernen des Bisbenzimidis und CsCl	13
5.6. Mengenbestimmung der isolierten Mitochondrien-DNS .	13
5.7. Spaltung der mtDNS mit Restriktionsnukleasen	14
5.8. Gelelektrophorese	15
5.8.1. Analytische Trennung von Restriktionsfragmenten .	15
5.8.2. Auftrennung verschiedener Nukleinsäurespezies . .	15

5.9. Molekulargewichtsbestimmungen im Agarosegel	15
5.9.1. Molekulargewichtsbestimmung von mitochondrialer DNS	15
5.9.2. Bestimmung der Restriktionsfragmentlänge	16
5.10. Isolierung von Restriktionsfragmenten	16
5.10.1. Isolierung von Restriktionsfragmenten durch Extraktion	16
5.10.2. Isolierung von Restriktionsfragmenten durch Elektrophorese	17
5.11. c-RNS-Synthese mit mitochondrialer DNS als Vorlage .	17
5.12. "Nick Translation" mitochondrialer DNS	18
5.13. Übertragung von DNS aus Agarosegelen auf Nitro- zellulosefilter	19
5.14. Hybridisierung von filtergebundener DNS mit radioaktiver c-RNS	19
5.15. Hybridisierung von filtergebundener DNS mit radioaktiver "nick translatierter" mtDNS	20
5.16. Präparation und Gelelektrophorese mitochondrialer RNS	21
5.17. Bindung von RNS aus MHg-hydroxid-Agarosegelen an aktiviertes Whatmanpapier	21
5.17.1. Präparation von Aminobenzylloximethyl-Papier (ABM)	21
5.17.2. Aktivierung des ABM-Papiers	22
5.17.3. Vorbereitung des MHg-hydroxid-Agarosegels für den Transfer	23
5.17.4. Übertragung der RNS aus Agarosegelen auf DBM-Papier	23
5.18. Hybridisierung von filtergebundener RNS mit "nick translatierter" DNS	23
Ergebnisse	25 - 70
Teil 1: Kartierung des mitochondrialen Genoms mit Hilfe	

von c-RNS/DNS Hybridisierung	25
1. Möglichkeiten der Kartierung mit Hilfe von c-RNS/DNS Hybridisierung	25
2. Gelelektrophoretische Auftrennung verschiedener Nukleinsäurespezies	27
3. Hybridisierung der gelelektrophoretisch abgetrennten mtDNS gegen radioaktive, complementäre mtRNS	28
3.1. Übertragung der gelelektrophoretisch abgetrennten mtDNS auf Nitrozellulosefilter	29
3.2. c-RNS-Synthese	29
3.3. Hybridisierungsbedingungen	30
3.3.1. Temperatur	30
3.3.2. Verhältnis der DNS-Menge zur eingesetzten c-RNS	30
4. Bestimmung der Länge in rho ⁻ -Klonen enthaltener Wildtypsequenz	32
5. Zuordnung genetischer Marker zu molekularen Ab- ständen auf dem mitochondrialen Genom mit Hilfe von Hybridisierungsergebnissen	32
5.1. Lokalisierung durch c-RNS rho ⁺ /DNS rho ⁻ -Hybridi- sierung	32
5.1.1. COB	33
5.1.2. Oli 1	33
5.1.3. ts 983	33
5.1.4. Cap und tsm 8	33
5.1.4.1. Cap	33
5.1.4.2. tsm 8	34
5.1.5. Oxi 1	34
5.1.6. Oli 2	34
5.1.7. Oxi 3	34

5.1.8. Par	35
5.1.9. Oxi 2	35
5.2. Ergänzende Daten zur Lokalisierung mit Hilfe von c-RNS rho ⁻ /DNS rho ⁻ Hybridisierung	35
6. Erstellung einer physischen Hybridisierungskarte des mitochondrialen Genoms	37
Teil 2: Physische Kartierung der COB Region und Lokali- sierung ihrer codierenden Bereiche	38
7. Restriktionsanalysen der DNS aus rho ⁻ Klonen	39
7.1. Möglichkeiten der Reiteration	39
7.2. Identifizierung der Reiterationen der DNS einzelner rho ⁻ Klone	40
7.3. Identifizierung nicht "idealer" rho ⁻ Klone	41
8. Längenbestimmung mitochondrialer Restriktions- fragmente	42
9. "Nick Translation"	43
9.1. Theorie der "Nicktranslation"	43
9.2. Durchführung der Reparatursynthese	44
9.3. Abtrennung der radioaktiven DNS von nicht- eingebauten Triphosphaten	45
9.4. Nachweis der durchgehend gleichmäßigen Markierung	45
10. Eingrenzung der COB Region	46
10.1. Maximale Länge der COB Region	46
10.2. Minimale Länge der die COB Region enthaltenden Sequenz	49
11. Die COB Region - ein Mosaicgen	51
11.1. Nachweis der Mosaicgen-Struktur der COB Region auf DNS Ebene	53
12. Feinstkartierung der COB Region	54

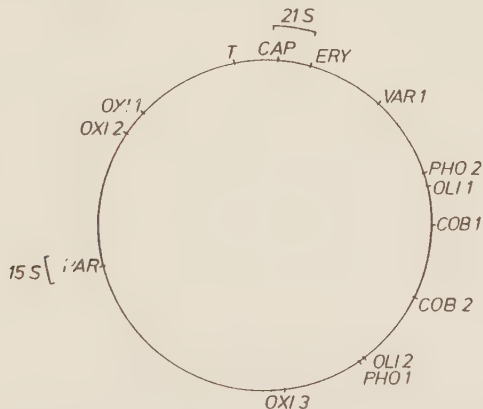
12.1. HpaII Karte	54
12.1.1. Lokalisierung der Bande 2	55
12.1.2. Lokalisierung der Bande 9	56
12.1.3. Lokalisierung der Bande 3	56
12.1.4. Lokalisierung der Banden 5a und 6	57
12.1.5. Lokalisierung der Bande 1	57
12.2. HaeIII Karte	58
13. Lokalisierung der DNS von ρ^- Mutanten durch Restriktionsanalysen	59
14. Zuordnung der codierenden Sequenzen (Exons) der COB Region zu der Restriktionskarte mit Hilfe genetisch charakterisierter ρ^- Mutanten	60
14.1. Exon $\mathcal{E}$	61
14.2. Exon $\mathcal{F}$	61
14.3. Exon γ	61
14.4. Exon β	62
14.5. Exon α	62
Teil 3: Identifizierung der COB Transkripte	64
15. Modell der Transkription (Translation) eines Mosaicgenes	64
16. RNS Gelelektrophorese	65
16.1. Molekulargewichtsbestimmung der RNS Spezies im MHg-hydroxid-Agarosegel	66
17. Bindung von RNS aus MHg-hydroxid-Agarosegelen an DBM Papier	67
18. Hybridisierung von filtergebundener Wildtyp RNS mit verschiedenen DNS Sequenzen aus der COB Region	67
18.1. Hybridisierung von filtergebundener Wildtyp RNS mit Exon/Intron Sequenzen der COB Region	67

18.2. Hybridisierung von filtergebundener Wildtyp RNS	
mit einem DNS Fragment aus Intron α/β	69
18.3. Hybridisierung filtergebundener Wildtyp RNS mit	
DNS Sequenzen aus Intron α/β und Exon β	70
Diskussion	72 - 81
Tabellen	82 - 90
Abbildungen	91 - 125
Literaturverzeichnis	126 - 142
Zusammenfassung	143 - 144

E i n l e i t u n g

Der Erbträger des Mitochondrions von *Saccharomyces cerevisiae*, der Bäckerhefe, ist ein ringförmiges DNS-Molekül von 25 μm Länge und einem Molekulargewicht von ca. 50×10^6 Dalton. Dieses Genom codiert nur einen kleinen Teil des Organells; die Synthese der meisten übrigen mitochondrialen Komponenten dagegen wird vom genetischen System des Zellkerns gesteuert und findet im Cytoplasma statt (Schatz und Mason, 1974).

Bisher konnte nachgewiesen werden, daß die Genorte für 23 tRNS-Spezies, die ribosomale 15 S und 21 S RNS und für 7 Polypeptide auf der mtDNS lokalisiert sind (Tzagoloff et al., 1973; Mason und Schatz, 1973; Katan et al., 1976; Sanders et al., 1976; Butow et al., 1977).



Genetische Karte des mitochondrialen Genoms der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*; modifiziert nach Borst et al. (1977).

ERY, CAP, PAR, OLI bezeichnen Loci für Erythromycin-, Chloramphenicol-, Paronomycin- und Oligomycinresistenz; OXI 1, 2, 3 sind Genorte, welche die Biosynthese der Cytochrom c Oxidase betreffen; T bezeichnet einen Genort, der die Stabilität der mtDNS beeinflusst; PHO 1 und 2 sind Loci, welche die Biosynthese des Oligomycin-sensitiven ATPase-Komplexes betreffen; COB 1 und 2 bezeichnen zwei, die Biosynthese des Cytochroms *b* betreffende Loci; VAR 1 ist der Genort eines polymorphen Proteins mit bisher unbekannter Funktion. Die Loci der 21 S rRNS und der 15 S rRNS sind mit $\overline{\hspace{1cm}}$ gekennzeichnet.

Für die genetischen Analysen war es von großem Vorteil, daß bei *Sacch.cer.* drei verschiedene Klassen mitochondrial codierter Mutanten bekannt sind:

1. Resistenz-Mutanten, die auf Grund von mutativen Veränderungen in Komponenten der Ribosomen, des ATPase Komplexes oder des Apocytochrom b ihre Sensibilität gegenüber Antibiotika verloren haben (Gillham, 1974).

2. Mit⁻ Mutanten, die atmungsdefizient sind und meist den spezifischen Ausfall der enzymatischen Aktivität eines einzigen Komplexes der inneren Membran bewirken.

3. Rho⁻ Mutanten, die ebenso atmungsdefizient sind wie mit⁻ Mutanten, im Gegensatz zu jenen aber einen vollständigen Verlust der mitochondrialen Proteinsynthese und Deletionen langer Sequenzen der mtDNS aufweisen. Rho⁻ Mutanten stellen eine Art "Cloning" System der Hefezelle dar:

Der zurückbehaltene Teil des Genoms, meist 1-10% des Gesamten, liegt bis zur ursprünglichen Länge von 25 µm reiteriert und genetisch stabil vor (Faye et al., 1973; Locker et al., 1974a,b).

Die rho⁻ Mutanten haben sich als ausgezeichnetes Hilfsmittel zur Kartierung der Mutantenklassen 1 und 2 erwiesen, indem gleichzeitige Deletion bzw. Retention von zwei oder mehr Markern auf deren benachbarte Lage innerhalb des Gesamtgenoms schließen läßt. Dieser methodische Ansatz konnte zunächst für rein genetische Kartierungen (Tzagoloff et al., 1975; Slonimski und Tzagoloff,

1976; Kotylak und Slonimski, 1977a; Schweyen et al., 1977), aber auch für biochemisch/genetische angewendet werden (Sanders et al., 1976; Heyting und Sanders, 1976; Sripakash et al., 1976; Borst et al., 1977).

Der erste Teil dieser Arbeit nutzt das System der "Clonierung" einer zusammenhängenden Sequenz des Wildtypgenoms in rho⁻Mutanten, um genetische Marker den Abständen auf einer physischen Karte zuzuordnen. Der experimentelle Ansatz war durch eine Reihe kartierter rho⁻Mutanten (Schweyen et al., 1976) und durch die Möglichkeit gegeben, eine vereinfachte Technik für die gleichzeitige Analyse vieler Mutantenklone mit Hilfe der Hybridisierung von rho⁻DNS mit rho⁺ (rho⁻)c-RNS durchzuführen (Southern, 1975; Doxiadis, 1978).

Gleichermaßen vorteilhaft sind rho⁻Klone für die Kartierung einer kleinen Region innerhalb des mitochondrialen Genoms. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird daher zunächst an Hand von Restriktionsanalysen der DNS verschiedener rho⁻Klone Länge und Lage der Region bestimmt, die für Apocytochrom b codierend ist. Die sogenannte COB-Region wurde ausgewählt, da i) zahlreiche, genetisch kartierte mit⁻Mutanten innerhalb dieses Bereiches gekoppelt vorliegen (Kotylak und Slonimski, 1977b; Schweyen et al., 1977) und ii) es in jüngster Zeit gelungen ist, mit Hilfe von mit⁻Mutanten strukturelle Veränderungen im Cytochrom b Apoprotein aufzuzeigen (Claisse et al., 1977; Hanson et al., 1979; Haid et al., 1979), die auf eine Mosaik-Genstruktur dieser Region schließen lassen.

Daher war es weitergehend von Interesse, die Restriktionskarte der COB-Region zu verfeinern, um die Größe der codierenden Sequenzen und ihrer Lage auf dem mitochondrialen Genom zu bestimmen. Damit kann auch auf DNS-Ebene nachgewiesen werden, daß codierende Bereiche durch Abschnitte voneinander getrennt sind, deren Expression nicht zu einem Apocytochrom b Genprodukt führt.

Aufbauend darauf befaßt sich der letzte Teil dieser Arbeit mit den Transkriptionsprodukten der COB Region. Eine Voraussetzung für Analysen dieser Art war durch die Möglichkeit gegeben, verschiedene RNS Spezies gelelektrophoretisch trennen zu können (van Ommen und Groot, 1977; Morimoto et al., 1979), um dann durch Hybridisierung mit geeigneten DNS Proben aus der COB Region Aufschluß über das (die) COB Transkript(e) zu erhalten.

Die vorliegende Arbeit besteht damit aus drei Teilen, der Kartierung des gesamten mitochondrialen Genoms mit Hilfe von c-RNS/DNS Hybridisierung, der Feinkartierung der COB Region anhand von Restriktionsanalysen und der Untersuchung der Transkripte dieser Region.

Hier wurde nur eine Einführung in die allgemeinen Grundlagen der Thematik gegeben, da zum besseren Verständnis jedem Teil spezielle Erläuterungen vorangestellt sind.

M a t e r i a l u n d M e t h o d e n :

1. Stämme:

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Phagen(P22)DNS war ein Geschenk von Dr. H. Schmieger.

Nomenklatur:

rho⁺ bezeichnet atemungskompetente Zellen mit intaktem mitochondrialen Genom und funktionsfähigem Proteinsynthesystem.

rho⁻ bezeichnet atemungsdefekte Mutanten, deren mitochondriale Proteinsynthese als Ergebnis einer Deletion der mtDNS ausgefallen ist.

mit⁻ bezeichnet atemungsdefekte mitochondriale Mutanten mit funktionsfähigem Proteinsyntheseapparat.

rho⁰ bezeichnet atemungsdefekte Mutanten mit vollständigem Verlust der mitochondrialen DNS.

2. Medien:

YD-Medium

Hefeextrakt		10 g
Dextrose		30 g
H ₂ O dest.	ad	1 l

Die Dextrose wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

YG-Medium

Hefeextrakt		10 g
Glycerin		30 g
H ₂ O dest.	ad	1 l

YGal-Medium

Hefeextrakt		10	g
Galaktose		30	g
H ₂ O dest.	ad	1	l

Die Galaktose wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

YNB-Medium (Minimalmedium)

Yeast Nitrogen Base		6,7	g
Dextrose		30	g
H ₂ O dest.	ad	1	l

Die Dextrose wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

Für die Verwendung von Platten wurde dem jeweiligen Medium 1,5% Agar zugesetzt.

3. Chemikalien:

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, Enzyme von der Firma Boehringer, Mannheim, und radioaktive Isotope von der Firma Amersham-Buchler und Co KG, Braunschweig, bezogen.

Agar, Hefeextrakt	Difco, Detroit
Agarose	Seakem, Maine, USA
Bisbenzimid H 33258	Riedel de Haën, Hannover
Cäsiumchlorid (CsCl)	Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Lösungsmittel und Szintillatoren	Packard, Frankfurt
Methylquecksilber(II)-hydroxid	Ventron, Karlsruhe

((<u>Nitrobenzyloxi</u>)methyl)- <u>pyridinchlorid</u>	British Drughouse, Pool, England
Restriktionsnukleasen:	
HindII (HincII), HpaII (MspI)	
ØX 174, HaeIII-Spaltung	Biolabs, Massachusetts
Sarkosyl NL-30	Ciba-Geigy, Basel
Sepharose G 50, G 100	Deutsche Pharmacia, Freiburg
Zymolase 5000	Kirin Brewery Co LTD, Japan

4. Abkürzungen:

A(C,G,U)TP	Adenosin(Cytidin-,Guanosin-,Uridin-)-5'- triphosphat
ABM	<u>Aminobenzyloximethyl</u>
AluI	Restriktionsnuklease aus <i>Arthrobacter</i> <i>luteus</i>
BamHI	Restriktionsnuklease aus <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> H
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	counts (Zerfälle) pro Minute
DBM	<u>Diazobenzyloximethyl</u>
DNS	Desoxiribonukleinsäure
mtDNS	mitochondriale DNS
DTT	Dithiothreitol
Eb	Ethidiumbromid
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	Restriktionsnuklease aus <i>E.coli</i> BS 5
EDTA	Äthylendiamintetraazetat
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

HaeIII	Restriktionsnuklease aus <i>Haemophilus aegypticus</i>
HindII (III) (HincII)	Restriktionsnuklease aus <i>Haemophilus influenzae</i>
HpaII (MspI)	Restriktionsnuklease aus <i>Haemophilus parainfluenzae</i> (Isoschizomer zu MspI, Restriktionsnuklease aus <i>Moxarella species</i>)
MG	Molekulargewicht
MHg-hydroxid	Methylquecksilber(II)hydroxid
min	Minuten
Na	Natrium
NBM	<u>N</u> itro <u>b</u> enzyloxi <u>m</u> ethyl
NBPC	((<u>N</u> itro <u>b</u> enzyloxi)methyl)pyridinchlorid
OD	optische Dichte
POPOP	1,4-Di-2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNS	Ribonukleinsäure
c-RNS	komplementäre RNS
mRNS	Messenger RNS
mtRNS	mitochondriale RNS
rRNS	ribosomale RNS
tRNS	Transfer RNS
Sacch. cer.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEA	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA- <u>A</u> zetat-Puffer
TEB	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA- <u>B</u> orat-Puffer

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Wt	Wildtyp

5. Methoden:

5.1. Züchtung von Hefezellen

Die Hefezellen der verwendeten Wildtypstämme wurden in YG-Medium unter Schütteln gezüchtet, die der rho⁻Stämme in YD- bzw. in YGal-Medium. Der Wildtyp KL14-4A und die von ihm abstammenden rho⁻Stämme wurden zur Züchtung bei 32°C, alle anderen Stämme bei 23°C geschüttelt.

5.2. Isolierung von Nukleinsäuren aus Hefemitochondrien

5.2.1. Isolierung der Mitochondrien

Für die DNS-Gewinnung aus Mitochondrien wurde die Methode von Lang et al. (1977) angewendet. Hefezellen der späten logarithmischen Phase (5×10^7 Zellen/ml bis 1×10^8 Zellen/ml) wurden sedimentiert (3000 x g, 10 min bei 5°C), in Sorbitolpuffer pH 6,8 (Sorbitol 0,6 M, EDTA 2 mM, Tris HCl 10 mM) gewaschen, dann in demselben Puffer aufgenommen (3 ml/g Zellaßgewicht), mit 2 Teilen Glasperlen vermischt und bei 4°C höchstens 1 1/2 min kräftig geschüttelt. Der Prozentsatz der aufgebrochenen Zellen wurde mikroskopisch verfolgt. Die Suspension wurde dann bei 1500 x g (3 min bei 4°C) abzentrifugiert, der Überstand bei 4°C aufbewahrt und mit dem Pellet der "Knackvorgang" so oft wiederholt, bis 70 - 80% der Zellwände aufgebrochen waren. Die gesammelten Überstände wurden danach 1/2 min bei 7700 x g, 4°C, abgeschleudert, das Pellet verworfen und der Überstand 20 min mit 48000 x g, bei 4°C,

abzentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das weiche Mitochondrienpellet in reichlich Sorbitolpuffer vorsichtig suspendiert und nochmals bei 48000 x g, 20 min bei 4°C, abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang der Mitochondrien wurde 1 x wiederholt und dann das Mitochondrienpellet gewogen und in 5 ml Tris-EDTA-Puffer/0,5 g Mitochondrien (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,65) ebenfalls vorsichtig suspendiert.

5.2.2. Lyse von Mitochondrien für Gradienten:

Zu der Mitochondriensuspension gab man 2% SDS und 2% Sarkosyl und schüttelte vorsichtig um, bis die Lösung durchsichtig geworden war (ca. 1/2 min).

5.2.3. Lyse von Mitochondrien für die Gelelektrophorese:

Sollten die aus den Mitochondrien isolierten Nukleinsäuren danach gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, wurde die Lyse mit 2% Sarkosyl NL 30 bei 60°C für 10 min durchgeführt.

5.2.4. Extraktion von Proteinen:

Zu der Lösung wurde sofort dieselbe Menge Phenolmix (0,1% Hydroxichinolin, 10% mKresol, 12,5% H₂O dest, destilliertes Phenol ad 100 ml) zugegeben und in einem Kolben 15 min lang in Eis langsam geschüttelt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt (17700 x g, 10 min bei 4°C). Die obere wässrige Phase wurde abpipettiert und eine weitere Phenolextraktion durchgeführt. Anschließend wurden aus der wässrigen Phase die Nukleinsäuren mit dem 2 1/2fachen Volumen Äthanol bei -20°C mindestens 2 Stunden ausgefällt.

5.3. Isolierung von Nukleinsäuren aus Hefeprotoplasten:

Für die DNS-Gewinnung aus Hefeprotoplasten wurde eine veränderte Methode (Lang, pers. Mitteilung) von Kováč et al. (1972) verwendet. Hefezellen der mittleren logarithmischen Phase ($1 - 2 \times 10^7$ Zellen/ml) wurden wie unter 5.2. beschrieben abzentrifugiert und in 7,5 ml/g Zellen Citratpuffer (Citrat 50 mM, EDTA 20 mM, Sorbitol 1,5 M, Mercaptoäthanol 0,3%, pH 7,2) aufgenommen. Zu dieser Suspension wurde dann entweder Helicase (in einer Endkonzentration von 2 - 5 Vol%) oder 0,03% (g/Vol) Zymulase zugegeben. Die Enzymreaktion wurde lichtmikroskopisch verfolgt und war dann beendet (ca. 15 - 20 min), wenn 60 - 80% der Zellen als Protoplasten zu erkennen waren. Die Suspension wurde mit $5900 \times g$, 5 min bei 4°C , abzentrifugiert, das Pellet in demselben Puffer 1 x gewaschen und danach in 15 ml Sorbitolpuffer (siehe 5.2.) vorsichtig suspendiert. Nach Lyse der Zellen mit 2% SDS (1 - 2 min) wurde die nun durchscheinende Lösung 5 min lang bei $45000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert, das Pellet verworfen, der Überstand mit dem 2,5fachen Volumen Äthanol versetzt und bei -20°C mindestens zwei Stunden aufbewahrt. Die gefällten Nukleinsäuren und Proteine wurden bei $48000 \times g$, 4°C , 20 min abzentrifugiert, in Tris-EDTA-Puffer (siehe 5.2.1.) gelöst und zwei Phenolextraktionen (siehe 5.2.4.) durchgeführt. Die wässrige Phase wurde mit dem 2,5fachen Volumen Äthanol bei -20°C mindestens 2 Stunden stehen gelassen.

5.4. Isolierung der mitochondrialen DNS durch Dichtezentrifugation

Die in äthanolischer Lösung gefällten Nukleinsäuren wurden bei $48000 \times g$, 4°C , 20 min abzentrifugiert und in Tris-EDTA-Lösung (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) gelöst.

5.4.1. NaJ-Dichtegradienten

Die Herstellung von NaJ-Dichtegradienten wurde, wie in der Dissertation von Doxiadis, 1978, beschrieben, durchgeführt.

5.4.2. CsCl-Dichtegradienten

Bei Verwendung von CsCl für die Dichtezentrifugation wurde zu 1 ml Nukleinsäurelösung 1,15 g CsCl gegeben, was einer mittleren Dichte des Gradienten von $1,59 \text{ g/ccm}^3$ entspricht. Zum Sichtbarmachen der DNS wurden $2 \mu\text{g/ml}$ Bisbenzimid hinzugefügt, ein Reagenz, das - soweit bekannt - spezifisch an AT-reiche Regionen der DNS bindet (Müller et al., 1975). Die Zentrifugationen sowohl der CsCl-Gradienten als auch der NaJ-Gradienten erfolgten bei 21°C , $120000 \times g$ für 48 Stunden (CsCl-Gradienten) bzw. 62 Stunden (NaJ-Gradienten) in einer Beckmann Ultrazentrifuge Modell L5-50.

Nach der entsprechenden Zentrifugationszeit wurde die durch ihre Fluoreszenz im UV-Licht deutlich sichtbare Mitochondrien-DNS-Bande durch seitliches Anstechen der Zentrifugenröhrchen (Abb.1) mit einer sterilen Einmalspritze entnommen. Wenn es für die Folgeexperimente erforderlich war, sehr reine, Kern-DNS-freie Mitochondrien-DNS zu erhalten, folgte eine zweite, wie oben beschriebene, Ultrazentrifugation.

5.5. Reinigen der Mitochondrien-DNS nach dem Dichtegradienten:

5.5.1. Entfernen des Ethidiumbromids und des NaJ:

Zum Entfernen des Eb wurde die DNS-Lösung mit derselben Menge Iso-Amylalkohol ausgeschüttelt, wobei sich das Eb von der DNS ablöst und in der alkoholischen Phase verbleibt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die wässrige Phase im UV-Licht keine Fluoreszenz mehr aufwies.

Um das NaJ zu entfernen, wurde die Lösung 16 Stunden, mit dreimaligem Wechsel, gegen Tris-EDTA-Puffer pH 7,6 dialysiert, mit Polyäthylenglycol eingeengt und danach nochmals für 2 Stunden dialysiert.

5.5.2. Entfernen des Bisbenzimid und CsCl:

Bisbenzimid wurde aus der CsCl-DNS-Lösung genauso entfernt, wie unter 5.5.1 für Eb beschrieben, nur daß Iso-Propanol zum Ausschütteln benutzt wurde. Es folgte danach, ebenso wie unter 5.5.1. beschrieben, eine Dialyse gegen Tris-EDTA pH 7,6, für mindestens 48 Stunden mit 6maligem Pufferwechsel.

Nach der Dialyse wurden zwei Phenolextraktionen durchgeführt, um restliche Proteine zu entfernen; dann wurde die DNS durch Zugabe des 2,5fachen Volumens Äthanol bei -20°C mindestens 2 Stunden ausgefällt.

5.6. Mengenbestimmung der isolierten Mitochondrien-DNS:

Die optische Dichte einer verdünnten DNS-Lösung wurde in einem Einstrahlspektralphotometer im ultravioletten Bereich bei 320 - 230 nm verfolgt; das Absorptionsmaximum

der DNS liegt bei 260 nm. Eine Einheit optischer Dichte (OD) entspricht ca. 50 μg DNS.

5.7. Spaltung der mtDNS mit Restriktionsnukleasen:

1 - 2 μg DNS wurden bei 37°C mit 1 - 2 Einheiten Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 50 μl 1,5 Stunden inkubiert.

Folgende Spaltpuffer wurden verwendet:

Spaltung mit EcoRI: 0,1 M Tris HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , pH 7,5 (Hedgpeth et al., 1972)

Spaltung mit HindII, HindIII, HindII+III: 10 mM Tris HCl, 7 mM MgCl_2 , 60 mM NaCl, 7 mM 2-Mercaptoäthanol, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, pH 7,9 (Landy et al., 1974)

Spaltung mit BamHI: 6 mM Tris HCl, 20 mM KCl, 6 mM MgCl_2 , 6 mM DTT, pH 7,5 (Boehringer Mannheim, Mitteilungen)

Spaltung mit AluI: 50 mM NaCl, 6 mM Tris HCl, 6 mM MgCl_2 , 6 mM DTT, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, pH 7,6 (Roberts et al., 1976)

Spaltung mit HaeIII, HpaII: 10 mM Tris HCl, 10 mM MgCl_2 , 6 mM KCl, 1 mM DTT, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, pH 7,4 (Sharp et al., 1973)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 2,5 M Na-Azetat (pH 5,5) und 2,5 Volumen Äthanol gestoppt und die DNS bei -80°C (30 min) oder bei -20°C (2 Stunden) ausgefällt.

Nach dem Abzentrifugieren der Proben (Eppendorf-Tischzentrifuge, 15 min, 2000 x g) wurde der DNS-Niederschlag in 15 μl Tris-EDTA-Puffer (5.2.1.) aufgenommen und mit 5 μl Bromphenolblaulösung versetzt (0,7% Bromphenolblau, 10 mM EDTA, pH 8, 50% Glycerin).

5.8. Gelelektrophorese:

5.8.1. Analytische Trennung von Restriktionsfragmenten:

Zur Auftrennung von Restriktionsfragmenten wurden Agarose-Plattengele verwendet (senkrecht: 12 x 17 x 0,3 cm; waagrecht: 13 x 21,5 x 0,3 cm). Abhängig von der Größe der Restriktionsfragmente betrug die Agarosekonzentration 0,7% oder 1,5%. Die Elektrophorese senkrechter Gele erfolgte 14 Stunden bei 20 Volt, 20°C, in Tris-EDTA-Azetat-Puffer (40 mM Tris, 33 mM NaAc, 2 mM EDTA_{II}, pH 8,3; Tanaka und Weisblum, 1972) + 1 µg Eb/ml; waagrechte Plattengele wurden für 6 Stunden bei 60 Volt, 20°C, in Tris-EDTA-Boratpuffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA_{II}, pH 8,3; Peacock und Dingman, 1967) + 1 µg/ml Eb elektrophoretisiert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit einem Durst Laborator (im Auflicht: 20 - 40 min, Blende 11; im Durchlicht: 120 Sekunden, Blende 16) photographiert.

5.8.2.

Auftrennung verschiedener Nukleinsäurespezies:

Zur Auftrennung verschiedener Nukleinsäurespezies aus lysierten Mitochondrien (30 µl Lysat + 10 µl Bromphenolblaulösung) wurden 0,6% Agaroseplattengele, waagrecht, verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in TEA-Puffer bei 4°C, 10 V/cm, für 14 Stunden.

5.9. Molekulargewichtsbestimmungen im Agarosegel:

5.9.1. Molekulargewichtsbestimmung von mitochondrialer DNS:

Die Molekulargewichtsbestimmung ungespaltener mtDNS im Agarosegel wurde von I. Doxiadis durchgeführt (Grosch, Doxia-

dis et al. 1977; Doxiadis, Dissertation 1978).

5.9.2. Bestimmung der Restriktionsfragmentlänge:

Die Länge der Restriktionsfragmente wurde durch Co-Elektrophorese mit DNS-Fragmenten bekannter Länge bestimmt. Fragmente mit einer Länge von mehr als 1000 Basenpaaren wurden mit EcoRI gespaltener P22 DNS co-elektrophoretisiert (Jackson et al., 1978), kleinere Fragmente mit ϕ X174 DNS, HaeIII gespalten, bzw. mit ϕ X174 DNS/HaeIII + P22 DNS/EcoRI als Marker elektrophoretisiert (Sanger et al., 1978).

5.10. Isolierung von Restriktionsfragmenten:

5.10.1. Isolierung von Restriktionsfragmenten durch Extraktion:

Die im UV-Licht fluoreszierenden Restriktionsbanden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und die DNS - ähnlich wie von Thuring et al. (1975) beschrieben - aus der Agarose extrahiert. Dazu wurden die Gelstückchen 2 Stunden bei -20°C gehalten, danach mit flüssigem Stickstoff auf -180°C gebracht und in einem ebenso kalten Mörser zerstöselt. Vor dem Auftauen wurde zu der feinpulverisierten Agarose 200 μl Phenol gegeben und nach dem Auftauen eine Phenolextraktion durchgeführt. Durch die folgende Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 10 min) setzte sich die Agarose in der Mittelschicht zwischen phenolischer und wässriger Phase ab, das Eb dagegen blieb im Phenol gelöst. Die Phenolextraktion wurde 1 - 2 x wiederholt und eine Äthanol-fällung durchgeführt.

5.10.2. Isolierung von Restriktionsfragmenten durch Elektrophorese

Die herausgeschnittenen Restriktionsbanden wurden in einen Dialyseschlauch gegeben, der Dialyseschlauch in ein elektrisches Feld gelegt und die DNS bei 80 - 100 Volt in TEB-Puffer aus dem Gel an die Dialysemembran elektrophoretisiert. Die DNS konnte durch Sichtbarmachen im UV-Licht vorsichtig von der Membran abpipettiert und mit 2 Phenolextraktionen und anschließender Äthanol-fällung von Eb und Agaroseresten befreit werden.

5.11. c-RNS-Synthese mit mitochondrialer DNS als Vorlage: Für die Synthese von komplementärer RNS mit mtDNS als Vorlage wurden 0,2 - 2 μg DNS bei 37°C in folgendem Synthesemix inkubiert: Tris HCl 50 mM, MgAc 30 mM, KCl 250 mM, pH 7,5, GTP, CTP je 1 mM, ^3H UTP, ^3H ATP je 25 μCi , H_2O ad 250 μl (D. Y. Thomas, persönliche Mitteilung). Die RNS-Synthese wurde verfolgt, indem nach bestimmten Zeiten je 1 μl entnommen und auf Whatman Glasfaserfilter gegeben wurde; die Filter wurden in 5% TCA + 0,1% $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7$ -Lösung 10 min in Eis geschwenkt, danach in 70% kaltem Äthanol 2 min gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität jedes Filters unter Zugabe von 3 ml Szintillationsmix (PPO 4 g, POPOP 0,1 g, Toluol ad 1 l) im Szintillationszähler bestimmt.

Wenn die Syntheserate ein Plateau erreicht hatte, (vgl. Abb.2), wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μl DNase gestoppt, eine Phenolextraktion durchgeführt und die syn-

thetisierte RNS von den nicht eingebauten Triphosphaten durch eine Molekularsiebsäule (Sephadex G100 - Pharmacia - mit 2 x SSC equilibriert) getrennt und die RNS-enhalten-den Fraktionen gesammelt (Abb.3).

Die spezifische Aktivität der c-RNS betrug zwischen 5×10^6 - 1×10^7 cpm/ μ g eingesetzter DNS.

5.12. "Nick Translation" mitochondrialer DNS:

0,1 - 1,0 μ g mitochondrialer DNS oder Restriktionsfragmen-te mitochondrialer DNS wurden bei 18°C in folgendem Mar-kierungsgemisch inkubiert (Rigby et al., 1977): dAT³²P, dCT³²P je 0,8 μ M, Tris HCl 40 mM, pH 8, dGTP, dTTP 5 μ M, MgCl₂ 6 mM, 2-Mercaptoäthanol 10 mM, DNS Polymerase 1 Ein-heit (1 μ l). Endvolumen: 100 μ l

Der Einbau der Radioaktivität in die DNS wurde ebenfalls verfolgt (s.5.11.), nur daß dazu je 1 μ l des Synthesege-misches in 1 ml 1 N HCl + 1% NaH₂PO₄ + 1% Na₄P₂O₇ + 50 μ g Heringssperma-DNS gefällt, auf Glasfaserfilter abgesaugt und dann die eingebaute Radioaktivität bestimmt wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA zu einer Endkonzentra-tion von 50 mM beendet, eine Phenolextraktion durchgeführt und die DNS von den nicht eingebauten Triphosphaten über eine Sephadex G50 Säule (mit 10 mM Tris, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8 equilibriert) abgetrennt (Rigby et al., 1977).

Um die Größe der DNS und ihre Menge abzuschätzen, wurden je 5 μ l der in Frage kommenden DNS-Fraktionen auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt, photographiert, anschließend getrocknet, autoradiographiert (Kodak X Ray O Mat Film)

und die entsprechenden Fraktionen gesammelt. Die spezifische Aktivität der radioaktiven DNS betrug $1-6 \times 10^7$ cpm/ μ g.

5.13. Übertragung von DNS aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter

Die mit Eb angefärbten Agarosegele wurden entweder im ganzen oder einzelne, mitochondriale DNS enthaltende, Gelblöckchen in 0,5 N NaOH bei Raumtemperatur 10 min lang leicht geschüttelt, um die DNS zu denaturieren, dann pro ml NaOH 9 ml eiskaltes Neutralisationsgemisch (0,5 M NaCl, 0,12 M HCl, 0,125 M Tris pH 7,5) zugegeben (D. Y. Thomas, persönliche Mitteilung), in Eis 20 min lang geschüttelt und danach 20 min lang in 20 x SSC equilibriert. Das Gel wurde auf 2 Lagen in 20 x SSC getränktes Whatman 3 MM Papier gelegt, mit 2 Lagen in 2 x SSC angefeuchtetem Nitrozellulosefilter (Millipore HAWP 29300) bedeckt, 5 trockene Nitrozellulosepapiere und eine dicke Schicht aus saugfähigem Zellstoff darübergegeben und mit mehreren Glasplatten beschwert (Abb.4). Zwei Stunden lang mußte alle 20 min die feuchte Zellstofflage gegen eine trockene ausgewechselt werden. Die Übertragung wurde nachts bei 4°C weitergeführt (Southern, 1975). Das unterste Nitrozellulosefilter wurde am nächsten Tag in 2 x SSC 15 min gewaschen, an der Luft getrocknet und bei 80°C im Vakuumofen 120 min gebacken.

5.14. Hybridisierung von filtergebundener DNS mit radioaktiver c-RNS

Aus dem mit mitochondrialer DNS beladenen Nitrozellulosefilter wurden runde Filterchen ($\varnothing$ 0,7 cm) ausgestanzt, die

Filterchen nummeriert und zusammen mit einem unbehandelten Filter in 5 x SSC, 50% Formamid, deionisiert (Pinder et al., 1974), + $1-1,5 \times 10^5$ cpm radioaktiver RNS/ml Hybridisierungsgemisch (= 5-10 ng RNS) für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Hybridisierungszeit wurden die Filterchen kurz in Chloroform geschwenkt, dann bei Raumtemperatur 2 x je 15 min in 2 x SSC gewaschen, in 1 x SSC-Puffer mit 30 µg/ml RNase T₁ und RNase A für 30 min inkubiert, danach noch zweimal je 10 min in 2 x SSC gewaschen, getrocknet und in einem Szintillationszähler mit Szintillationsmix (5.11.) die Radioaktivität jedes einzelnen Filters bestimmt (Southern, 1975; D.Y. Thomas, persönliche Mitteilung).

5.15. Hybridisierung von filtergebundener DNS mit radioaktiver "nick translatierter" mtDNS:

Die DNS-tragenden Nitrozellulosefilter wurden bei 60°C zuerst für 30 min in 3 x SSC, dann 30 min lang in Denhardts-Lösung (0,02% Ficoll, 0,02% BSA, 0,02% Polyvinylpyrrolidon in 3 x SSC; Denhardt, 1966) und zuletzt 60 min in Denhardts-Lösung + 0,1% SDS + 50 µg/ml niedermolekulare, denaturierte Träger-DNS (Heringsperma) inkubiert. Die Hybridisierung wurde ebenfalls in oben genannter Denhardts-Lösung + SDS + Träger-DNS durchgeführt. Um das Volumen der Hybridisierungslösung möglichst klein zu halten, wurden die Filter zwischen zwei Polyäthylenfolien gelegt, die Folien an drei Seiten zugeschweißt (Steinmetz, persönliche Mitteilung), das Inkubationsgemisch hinzugegeben (pro Filterstreifen - 20 x

1 cm - 2 ml Lösung + 5 - 25 ng radioaktive DNS) und die vierte Seite der Folien luftblasenfrei zugeschweißt. Die Hybridisierungsdauer betrug 16 Stunden bei 60°C. Zum Entfernen nicht gebundener radioaktiver DNS wurden die Filter bei 60°C sechsmal für je 5 min in 50 ml Hybridisierungslösung geschüttelt, danach 2 x 15 min in 0,1 x SSC + SDS + Träger-DNS (siehe oben) bei 60°C gewaschen. Anschließend wurden die Filter kurz in 3 x SSC geschwenkt, getrocknet und eine Autoradiographie erstellt (Kodak X Ray O Mat Film).

5.16. Präparation und Gelelektrophorese mitochondrialer RNS:
Die Präparation und die Gelelektrophorese mitochondrialer RNS wurde von A. Haid durchgeführt (Schmelzer, Haid, Grosch et al., in Vorbereitung).

5.17. Bindung von RNS aus MHg-hydroxid-Agarosegelen an aktiviertes Whatmanpapier:

5.17.1. Präparation von Aminobenzylloximethyl-Papier (ABM):
0,8 g ((Nitrobenzylloxi)methyl)pyridinchlorid (NBPC) und 0,25 g Na-Azetat wurden in 8 ml 70%igem Äthanol gelöst. Diese Lösung wurde gleichmäßig auf ein Blatt Whatman 540 Papier (20,5 x 17 cm) verteilt, das Papier auf einer Glasplatte befestigt und mit einem Kaltluftventilator getrocknet. Dieselbe Menge NBPC wurde in 100%igem Äthanol gelöst, das Papier wie oben mit der Lösung behandelt und nach dem Trocknen dieser Schritt einmal wiederholt (van Ommen, persönliche Mitteilung). Das so 3fach mit NBPC gesättigte Papier wurde getrocknet (mindestens 20 min bei 60°C) und sofort danach

35 min bei 135°C erhitzt. Das Papier wurde zweimal 20 min mit bi-distilliertem H₂O gewaschen, bei 60°C getrocknet und 2 x 20 min in Benzol leicht geschüttelt, an der Luft getrocknet und konnte so als NBM-Papier monatelang im Exsikkator bei 4°C aufbewahrt werden (Alwine et al., 1977 und 1979, im Druck).

Erst vor Gebrauch soll das NBM- in ABM-Papier umgewandelt werden. Dazu wurde es für 30 min in 20% Na-dithionit bei 60°C geschüttelt, 20 min mit destilliertem H₂O gewaschen, 20 min in 30%iger Essigsäure geschüttelt und danach so oft für jeweils 10 min mit Wasser gewaschen, bis kein Geruch nach H₂S mehr zurückblieb. Das ABM-Papier wurde 1 - 2 min aufgehängt, damit das Wasser abtropfen konnte.

5.17.2. Aktivierung des ABM-Papiers:

Die Aminobenzylloximethyl-Gruppen des ABM-Papiers werden durch Behandlung mit NaNO₂ in Diazobenzylloximethyl-Gruppen umgewandelt. Die Inkubations- wie die Waschschrirte müssen bei 4°C ausgeführt werden. Das ABM-Papier wurde dazu in 40 ml H₂O + 80 ml HCl + 3,2 ml NaNO₂-Lösung (10 mg/ml) 30 min inkubiert. Dabei reagieren die Aminogruppen (des ABM-Papiers) mit dem Nitrit zu reaktiven Diazoverbindungen (DBM-Papier). Mit Jod-Stärke-Papier sollte die Lösung auf freie HNO₂-Gruppen kontrolliert werden. Danach wurde das DBM-Papier 5 x 5 min lang mit eiskaltem H₂O (pH 5,8) gewaschen; dabei muß das Papier kanariengelb werden; zwei Waschschrirte (je 10 min) mit K-Phosphat-Puffer pH 5,8 schlossen sich an. Das Papier darf in dem eiskalten Puffer

bis zu Beginn des Transfers höchstens 15 min aufbewahrt werden.

5.17.3. Vorbereitung des MHg-hydroxid-Agarosegels für den Transfer:

Sollte das Gel photographiert werden, wurde es 60 min in Tris HCl pH 7,6 mit 0,1% 2-Mercaptoäthanol + 5 µg/ml Eb geschüttelt. Nach dem Photographieren wurde das Gel in 50 ml NaOH + 0,1% 2-Mercaptoäthanol (für 2 x 15 min), danach mit 0,2 M K-Phosphat + 7 mM Na-jodoazetat bei Raumtemperatur (für 2 x 10 min) inkubiert und 2 x 5 min mit 25 mM K-Phosphat-Puffer pH 5,8 gewaschen.

5.17.4. Übertragung der RNS aus Agarosegelen auf DBM-Papier:

Die Transferapparatur ist die gleiche wie für die Übertragung von DNS auf Nitrozellulosefilter (vgl. 5.13., Abb.4). Der Transfer wurde mit 25 mM K-Phosphat-Puffer pH 5,8 bei 4°C über Nacht durchgeführt. Sehr wichtig ist dabei, daß in den ersten zwei Stunden mindestens alle 20 min die feuchten Zellstofflagen gegen trockene ausgetauscht werden.

5.18. Hybridisierung von filtergebundener RNS mit "nick translatierter" DNS

Nach dem Transfer wurden die RNS-bindenden Filter in 5 x SSC + 50 µg/ml tRNS und 0,1% SDS aufbewahrt. Vor der Hybridisierung wird eine ähnliche Vorinkubation, wie unter 5.15. beschrieben, durchgeführt (Alwine et al., 1977). Die Filter wurden in 2 x SSC, 33% Formamid + 1% Glycin und 1 mg/ml Heringssperma-DNS für 4 Stunden bei 37°C vorinkubiert. Die

Hybridisierung wurde in dem gleichen Inkubationsgemisch (ohne Glycin) mit 25 ng radioaktiver DNS/ml für 16 Stunden ebenfalls bei 37°C durchgeführt. Zum Abwaschen der nicht hybridisierten DNS wurden die Filter 2 Stunden in 2 x SSC und 33% Formamid mit 6maligem Pufferwechsel bei 37°C geschüttelt und danach etwa 120 min mit 0,5 x SSC bei 60°C gewaschen (6 x Pufferwechsel), bis keine Abnahme der Radioaktivität mehr im Waschpuffer zu messen ist.

E r g e b n i s s e

Teil 1: Kartierung des mitochondrialen Genoms mit Hilfe von c-RNS/DNS Hybridisierung

Zu Beginn dieser Arbeit (Sommer 1976) waren einige Kartierungen des mitochondrialen Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* veröffentlicht: genetische Analysen der Co-Retention von Markern in Populationen von ρ^- Mutanten (Schweyen et al., 1976), Rekombinationsanalysen von solchen Mutanten (Slonimski und Tzagoloff, 1976; Tzagoloff et al., 1976a), molekulare Kartierung durch Hybridisierung von ρ^- mtDNS mit ρ^- DNS (Sriprakash et al., 1976; Nagley et al., 1976) und Restriktionsanalysen von ρ^+ DNS und ρ^- DNS (Sanders et al., 1976; Heyting und Sanders, 1976; Lewin et al., 1977; Morimoto et al., 1976). Diese Arbeit stellt eine einfache Methode vor, die es erlaubt, eine Reihe von genetisch charakterisierten ρ^- Mutanten biochemisch zu kartieren. Da die zur Verfügung stehenden ρ^- Klone (Schweyen et al., 1976) jeweils unterschiedliche Sequenzen des mtGenoms - ohne interne Deletionen - zurückbehalten haben, sollte es möglich sein, mit diesen Mutanten alle bekannten genetischen Marker molekularen Abständen zuzuordnen.

1. Möglichkeiten der Kartierung mit Hilfe von c-RNS/DNS Hybridisierung

Eine Möglichkeit, um eine molekulare Karte aufzustellen, ist die Hybridisierung der DNS aus verschiedenen ρ^- Klonen mit c-RNS (komplementärer RNS) des Wildtyps. Dabei muß

von zwei Voraussetzungen ausgegangen werden:

i) Der Prozentsatz, mit dem eine bestimmte ρ^- mit der c-RNS des Wildtyps hybridisiert, gibt die Länge der von der ρ^- zurückbehaltenen Wildtypsequenz wieder (in Prozent $\hat{=}$ Karteneinheiten). Die Hybridisierung von ρ^{+DNS}/ρ^{+c} -RNS wird dabei als 100% gesetzt. Diese 100% entsprechen dem Codierungsgehalt des gesamten mitochondrialen Genoms und können damit 100 Karteneinheiten gleichgesetzt werden.

ii) Das reiterierte mtDNS-Fragment eines Teils der für die Kartierung benutzten ρ^- -Klone muß im gleichen Festpunkt beginnen bzw. enden. Ein solcher kann durch ein Cluster von Mutationsorten gegeben sein. Die jeweilige ρ^- -Mutante sollte dann einen von zwei Markern innerhalb dieses Klusters enthalten, den zweiten jedoch nicht. Damit ist die DNS dieser Mutante in ihrem Anfangs- bzw. Endpunkt festgelegt. In Abb. 5 wurde zur Veranschaulichung einer solchen Kartierung ein hypothetisches Beispiel dargestellt.

Von einem Cluster D wird als Nullpunkt der Kartierung ausgegangen ($D \hat{=}$ 0 Karteneinheiten). Drei ρ^- -Klone enthalten innerhalb des Klusters D nur den Marker D α , nicht mehr jedoch D β .

Lokalisierung von Marker C: ρ^{-1} enthält 11% des Gesamtgenoms und dabei Marker C. Marker C muß also innerhalb 11% (Karteneinheiten) von D entfernt liegen.

Lokalisierung von Marker B: ρ^{-2} beherbergt 18% des Gesamtgenoms, von D α ausgehend, und die Marker C und D. Da ρ^{-1} Marker B nicht enthält, muß B zwischen 11 und 18

Karteneinheiten liegen.

Lokalisierung von Marker A und Eingrenzung von Marker B: ρ^{-3} trägt Marker C und B, nicht A. A kann also nicht weniger als 24 Einheiten von D entfernt beginnen. Nun können weitere ρ^{-} zur Analyse hinzugezogen werden, deren endständiger Marker nicht D^{α} sein muß, z.B. ρ^{-4} . ρ^{-4} ist nur 8 Karteneinheiten lang, enthält jedoch zwei Marker, B und A. Da B innerhalb von 11 und 18 liegt, A aber nicht vor 24 beginnen kann, muß B genau zwischen Karteneinheit 16 und 18 und A zwischen 24 und 26 lokalisiert sein. Wie die hypothetischen Loci A, B und C sollte versucht werden, alle bekannten genetischen Marker auf dem mitochondrialen Genom innerhalb der Bereiche zu lokalisieren, die sie maximal einnehmen könnten.

2. Gelelektrophoretische Auftrennung verschiedener Nukleinsäurespezies

Um zu einer raschen - wie oben beschriebenen - Kartierung zu kommen, war es notwendig, eine einfache Methodik zu verwenden, damit mtDNS relativ vieler ρ^{-} -Stämme rein dargestellt werden kann. Die Schwierigkeit liegt dabei in der Abtrennung dieser DNS-Spezies von anderen, in der Hefe-Zelle vorhandenen, DNS-Arten (Kern-DNS, 2 μ -DNS). Bei niederen Organismen konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, verschiedene DNS-Spezies auf Grund ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld eines Agarosegels aufzutrennen (Collins, 1976). I. Doxiadis hat diese Methodik aufgegriffen, um die Nukleinsäuren lysierter Hefeprotoplasten und -mitochondrien gelelektrophoretisch trennen zu können (Grosch, Doxiadis et

al., 1977; Doxiadis, Dissertation 1978). Bande I im Agarosegel (siehe Abb. 6), die in allen folgenden Versuchen Verwendung findet, enthält nach den Untersuchungen von I. Doxiadis kern-DNS-freie mitochondriale DNS. Das Molekulargewicht dieser DNS entspricht etwa 50×10^6 Dalton (Grosch, Doxiadis et al., 1977). Somit konnte die Gelelektrophorese als Trennverfahren verschiedener DNS-Spezies auch für He-fezellen verwendet werden. Dazu ist es nicht mehr notwendig, Mitochondrien z.B. über Urographin-Gradienten zu reinigen (Lang et al., 1977) und die verschiedenen DNS-Spezies durch Gradienten (Sanders et al., 1973; Blamire et al., 1972; Doxiadis, Dissertation 1978) oder Hydroxyapathit-Säulen zu trennen (Bernardi et al., 1972). Deshalb erschien die Methodik geeignet, um viele Mutanten-Klone gleichzeitig zu untersuchen. Ein Wildtypstamm und von ihm isolierte und genetisch charakterisierte ρ^- -Stämme wurden angezüchtet und aus 1×10^{10} Zellen pro Stamm Mitochondrien isoliert. Nach Lyse der Mitochondrien wurden die Proben sofort mit Bromphenolblau versetzt und bei 4°C im 0,6 % Agarosegel elektrophoretisiert. Das Elektrophoresemuster ist aus Abb. 6 zu ersehen. Auf die in den Geltaschen zu erkennende Eb-Fluoreszenz (DNS-Proteinaggregate) und die zweite, ihrer Mobilität nach 2 μ -DNS entsprechende Bande soll hier nicht weiter eingegangen werden.

3. Hybridisierung der gelelektrophoretisch abgetrennten mtDNS mit radioaktiver, complementärer mtRNS

3.1. Übertragung der gelelektrophoretisch abgetrennten DNS auf Nitrozellulosefilter

Von Southern wurde 1975 eine Technik entwickelt, mit deren Hilfe sich DNS von 500-1700 Basenpaaren in denaturierter Form aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter übertragen läßt. Dies bis dahin nur für Restriktionsfragmente angewandte Verfahren sollte es ebenso möglich machen, ungespaltene mitochondriale DNS vom Agarosegel auf Filter zu transferieren, da die mtDNS in Bande I (vgl. Abb. 6) in konzentrierter Form vorliegt. Ihr Molekulargewicht entspricht zwar ca. 50 Megadalton, nach der Denaturierung jedoch zerfällt die mtDNS auf Grund vorhandener Einzelstrangbrüche in Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 5000 Bp (T. Fox, persönliche Mitteilung). Diese Fragmentlänge ist für den Transfer geeignet (Southern, 1975). Daher konnten die mtDNS enthaltenden Gelblöckchen herausgeschnitten und die DNS - wie in 5.13. beschrieben - auf Nitrozellulosefilter übertragen werden.

3.2. c-RNS-Synthese

Die für diese Versuche eingesetzte radioaktive RNS wurde in vitro synthetisiert, mit mitochondrialer DNS als Vorlage. Das dazu notwendige Enzym ist die RNS Polymerase I, die ohne Zugabe eines "primers" bei unphysiologisch hoher Mg^{++} oder Mn^{++} Konzentration nicht an einem bestimmten "origin", sondern zufällig an einem Punkt des DNS-Moleküls beginnend, das ganze Genom transkribiert (Bishop, 1972).

3.3. Hybridisierungsbedingungen

3.3.1. Temperatur

Mitochondriale DNS aus Hefe zeigt ein sehr komplexes Schmelzkurvenmuster (Bernardi, 1976). Ungefähr die Hälfte der DNS wird schon bei 72°C denaturiert, was einem extrem hohen AT-Gehalt entspricht. Da die ideale Hybridisierungstemperatur für DNS/RNS bei 11°C unterhalb des DNS/DNS-Schmelzpunktes liegt, würde das in diesem Fall einer Hybridisierungstemperatur von 61°C entsprechen. Für die Experimente hat es sich als günstig erwiesen, bei hoher Salzkonzentration zu arbeiten (hier nicht gezeigte Vorversuche; Gillespie und Spiegelman., 1965; Southern, 1975). Hohe Salzkonzentration fördert jedoch die Bildung unspezifischer Hybride. Deshalb mußte die Temperatur auf 71°C erhöht werden. Statt hohe Temperaturen zu verwenden, kann Formamid als denaturierendes Agens eingesetzt werden; 10% Formamid kommen einer Temperaturerhöhung von 7°C gleich. Die Hybridisierung wurde in 5x SSC, 50% Formamid bei 37°C für 16 Std. durchgeführt.

3.3.2. Verhältnis der DNS-Menge zur eingesetzten c-RNS

Um einzelne Hybridisierungswerte miteinander vergleichen zu können, wurden 8 - 10 gleich große Filter, beladen mit DNS des Wildtyps oder verschiedener rho⁻Mutanten, in einem Ansatz mit c-RNS hybridisiert. Quantitative Aussagen können jedoch nur dann getroffen werden, wenn die filtergebundene DNS in hohem Überschuß im Vergleich zur c-RNS vorliegt. Die Begründung dafür ist folgende: die unterschiedliche Län-

ge des zurückbehaltenen Wildtypgenomabschnittes der einzelnen ρ^- -Klone führt zu verschiedenen Reiterationshäufigkeiten dieser DNS-Sequenzen. Hätte jedes DNS-Molekül die Möglichkeit, mit einem oder mehreren c-RNS-Molekülen zu hybridisieren, so würde eine ρ^- X, die diese Sequenz Z zehnfach reiteriert enthält, denselben Prozentsatz Hybridisierung zeigen wie die Wildtyp DNS, die Z nur einmal enthält. Anders ist es, wenn die c-RNS-Menge in großem Unterschuß vorhanden ist: dann ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein c-RNS-Molekül mit einem Wildtyp-DNS-Molekül zusammentrifft im genannten Beispiel 10^x größer als die Wahrscheinlichkeit, mit einem DNS-Molekül einer ρ^- -Mutante zu hybridisieren, die nur ein Zehntel des ρ^+ -Genoms zurückbehalten hat.

Zu einem Hybridisierungsansatz mit 8 - 10 DNS-beladenen Filtern wurden 5 - 10 ng radioaktive c-RNS gegeben, so daß das DNS/c-RNS Verhältnis immer über 100:1 lag. Unter diesen Bedingungen sollte die als ρ^+ -c-RNS eingesetzte Radioaktivität bei Hybridisierung mit ρ^+ DNS vollständig gebunden werden. Es konnte jedoch nur 40 % Bindung erreicht werden. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß im Gel noch vorhandenes Detergenz und Restproteine sich auf die Bindung der DNS an Filter bzw. die Hybridisierung störend auswirken. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, daß sich die maximal erreichbaren 40% Hybridisierung der c-RNS entsprechend dem prozentualen Anteil der gebundenen DNS-Sequenzen auf alle Filter gleich verteilen. Die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse sprechen für die Richtigkeit dieser Annahme.

4. Bestimmung der Länge in rho⁻-Klonen enthaltener Wildtypsequenz

Die Hybridisierungswerte von rho⁺-c-RNS wurden als Bezugsgröße gewählt, d.h. = 100% gesetzt. Die Hybridisierung mitochondrialer rho⁻-DNS mit rho⁺-c-RNS gibt dann den prozentualen Anteil des Wildtypgenoms an, der in dem jeweiligen rho⁻-Klone vorliegt (vgl. 2.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 im Vergleich zur genetischen Analyse dargestellt. Dabei wurden nur Daten aufgeführt, die für die folgende Kartierung notwendig sind. Wie zu ersehen ist, geben die biochemischen Daten die Länge der jeweils vorliegenden DNS-Sequenz in guter Übereinstimmung mit den genetischen Daten wieder.

5. Zuordnung genetischer Marker zu molekularen Abständen auf dem mitochondrialen Genom mit Hilfe von Hybridisierungsergebnissen

5.1. Lokalisierung durch c-RNS rho⁺/DNS rho⁻-Hybridisierung

Um von den in Tabelle 2 dargestellten Daten zu einer Kartierung des mitochondrialen Genoms zu kommen, war es notwendig, sich auf einen Festpunkt beziehen zu können (vgl. 2.). Das war durch ein Cluster von mit⁻(Punkt)Mutationen gegeben, die innerhalb der für Apocytochrom b (COB) codierenden Region liegen. Einige der zur Kartierung verwendeten rho⁻-Mutanten enthalten jeweils nur einen von zwei benachbarten Markern innerhalb dieses Klusters (Schweyen et al., 1977), deren Wildtyprekombinantenhäufigkeit in mit⁻ x mit⁻-Kreuzungen bei ca. 0,02% liegt (Kotylak und Slonim-

ski, 1977b). Die COB-Region wird damit als Anfangs- bzw. Endpunkt der Hybridisierungskartierung benutzt. In Abb. 7 wird gezeigt, wie die Lokalisierung der genetischen Marker im Einzelnen erfolgte:

5.1.1. COB:

Das gesamte mtGenom wird sowohl von COB 1282 (COB2, siehe Diskussion) als auch von COB 1431 (COB1) ausgehend in 100 Kartenabschnitte eingeteilt; das entspricht 100 Hybridisierungsprozent, wobei dann COB 1282 bzw. COB 1431 als Anfangspunkt 0% $\hat{=}$ 0 Kartenabschnitten gleichgesetzt wird.

5.1.2. Oli 1:

Rho⁻G31 enthält von COB 1431 ausgehend 11% des Gesamtgenoms und Marker Oli 1. Oli 1 liegt also maximal 11% von COB entfernt.

5.1.3. ts 983:

Rho⁻BB4 enthält 13 Kartenabschnitte und zusätzlich zu Oli 1 noch ts 983. Da rho⁻G31 ts 983 nicht enthält, muß ts 983 zwischen 11 und 13 Kartenabschnitte von COB entfernt liegen.

5.1.4. Cap und tsm 8:

5.1.4.1. Cap:

Rho⁻G81 enthält von COB ausgehend zusätzlich zu Oli 1 und ts 983 den Marker Cap. G81 ist 18 Kartenabschnitte lang. Da in rho⁻BB4 Cap nicht vorhanden ist, kann Cap nicht vor 13% beginnen und muß bei 18 enden.

5.1.4.2. tsm 8:

Rho⁻G71 enthält 24% des Gesamtgenoms, Marker Oli 1, ts 983 und Cap, aber nicht tsm 8. Marker tsm 8 kann daher nicht vor Kartenabschnitt 24 von COB entfernt beginnen. Unter Zuhilfenahme der rho⁻H31 können Cap und tsm 8 sehr genau lokalisiert werden:

H31-DNS hybridisiert nur zu 8% mit dem Gesamtgenom, trägt jedoch die Loci Cap und tsm 8. Da Cap innerhalb von Kartenabschnitt 13 und 18 liegt, tsm 8 aber nicht vor 24 beginnen kann, muß Cap genau zwischen Kartenabschnitt 16 und 18, tsm 8 zwischen 24 und 26 lokalisiert werden.

5.1.5 Oxi 1:

Sowohl rho⁻CA5 wie rho⁻CA3 enthalten 35 Kartenabschnitte von COB 1431 ausgehend und die Marker Oli 1, ts 983, Cap, tsm 8 und Oxi 1. Da Oxi 1 nicht vor 26 beginnen kann, ist es zwischen 26 und 35 zu lokalisieren.

5.1.6. Oli 2:

Die DNS-Sequenz der rho⁻AE5 reicht von COB 1282 aus über den äußersten COB-Marker, COB 1625, hinausgehend 11% in Richtung Oli 2. Rho⁻BB3 enthält 13% des Gesamtgenoms und außer COB 1282 - 1625 noch den Marker Oli 2. Oli 2 liegt daher zwischen Kartenabschnitt 11 und 13 in der zu Oli 1 entgegengesetzten Richtung.

5.1.7. Oxi 3:

Rho⁻G41 und AA2 beherbergen von COB 1282 ausgehend 25% des Wildtypgenoms, Oli 2 und den nächstäußersten Marker

eines Klusters von Mutationsorten innerhalb des Loci Oxi 3. Da hier vereinfachend Oxi 3 - wie auch COB - punktuell dargestellt werden soll, kann Oxi 3 25 Kartenabschnitte von COB aus lokalisiert werden.

5.1.8. Par:

Die DNS von rho⁻B61 hybridisiert zu 33% mit dem Gesamtgenom und reicht von COB aus über Oli 2 und Oxi 3 hinaus. Rho⁻AD2 enthält 42% der Wildtypsequenz und Marker Oli 2, Oxi 3 und Par. Par ist also zwischen 33 und 42% zu lokalisieren, da er nicht vor 33 beginnen und nach 42 enden kann. Genauer kann Par mit Hilfe der rho⁻F6/3 eingeengt werden, da F6/3 die Marker Oli 2, Oxi 3 und Par enthält und 26% lang ist. Weil Oli 2 mindestens bei Kartenabschnitt 13 beginnen muß, kann Par nicht weiter als $13 + 26 = 39$ Kartenabschnitte von COB entfernt sein, ist also damit zwischen 33 und 39% festgelegt.

5.1.9. Oxi 2:

Rho⁻H21 enthält 46% des Genoms von COB 1282 ausgehend und Marker Par, aber nicht Oxi 2. Rho⁻F6/2 hat Marker Par und Oxi 2-2532 zurückbehalten und ist 17 Abschnitte lang. Oxi 2 kann damit nicht vor 46 beginnen und nicht über 56 hinausragen, da F6/2 Par und Oxi 2 enthält.

5.2. Ergänzende Daten zur Lokalisierung mit Hilfe von c-RNS rho⁻/DNS rho⁻Hybridisierung

Unterstützende Daten und einige zusätzliche Informationen ergaben sich durch Versuche, für die als Matritze

für radioaktive RNS nicht ρ^+ DNS, sondern DNS einer ρ^- Mutante (G34 Σ 242) verwendet wurde; ρ^- G34 Σ 242 hat mit den Markern tsm 8, Oxi 1, Oxi 2 und Par insgesamt 50% des Gesamtgenoms zurückbehalten. Hierbei wurden die Hybridisierungswerte für ρ^- X (G34 Σ 242)DNS/ ρ^- X c-RNS als Bezugsgröße gewählt (= 100% gesetzt). Bei Hybridisierung einer beliebigen ρ^- Z gegen c-RNS der ρ^- X ergaben die Prozentwerte den Anteil der Überlappung der beiden Genome. Einige Daten dazu sind aus Tabelle 3 zu ersehen.

Die Ergebnisse sind für die Kartierung zu verwenden, da die Genomsequenz dieser ρ^- G34 Σ 242 i) durch ihren endständigen Marker tsm 8 genau zu lokalisieren ist (vgl. Abb. 7), ii) diese Sequenz 50% der Wildtypsequenz ausmacht und daher Hybridisierungswerte von c-RNS ρ^- X/DNS ρ^- Z (Prozent der Überlappung der beiden Genome) dem Doppelten der tatsächlichen Länge des Wildtypsegments entsprechen, das beide ρ^- Genome gemeinsam enthalten. Abb. 8 stellt ein Beispiel dar:

ρ^- X beginnt mit Marker E und überlappt mit ρ^- Y, die die Marker E und D trägt, zu 9,8% = 5% des Wildtypgenoms. Marker D muß also innerhalb von 5% vom Marker E entfernt liegen. ρ^- X und ρ^- Z hybridisieren zu 14% miteinander, haben also 7% des Wildtypgenoms gemeinsam. ρ^- Z hat nur noch Marker B zurückbehalten, nicht mehr C. Da ρ^- X Marker B nicht mehr enthält, kann Marker C erst 7% vor B beginnen.

6. Erstellung einer physischen Hybridisierungskarte des mitochondrialen Genoms

Mit den ergänzenden Daten aus 5.2. und den Ergebnissen aus 5.1. können die Entfernungen der genetischen Marker von Cap/Ery aus bestimmt werden. Cap/Ery beginnt definitionsgemäß bei 0 = 100 Karteneinheiten. Die Minimal- bzw. Maximalabstände der genetischen Marker von Cap/Ery aus sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Daraus resultiert eine zirkuläre Karte des mitochondrialen Genoms, die in Abb. 9 dargestellt ist. Die Lokalisierung der meisten Loci steht in guter Übereinstimmung mit Karten, die mit anderen Methoden erstellt wurden (siehe Diskussion).

Die hier dargestellte Methodik bietet im Vergleich zu anderen folgende Vorteile:

1. Es ist möglich, von einer geringen Zellzahl auszugehen.
2. Mitochondriale DNS wird durch Gelelektrophorese in einer definierten Bande konzentriert und kann so mit c-RNS hybridisiert werden.
3. Die Methodik ist einfach und schnell und erlaubt die gleichzeitige Analyse vieler rho⁻Stämme.

Sie wäre daher geeignet, alle weiteren genetischen Marker (z.B. Ana 1; Burger et al., 1977) einer physischen Karte zuzuordnen.

Teil 2: Physische Kartierung der COB Region und Lokalisierung ihrer codierenden Bereiche

Im Herbst 1977 wurden erste Ergebnisse bekannt, die einen Zugang zur Frage des Codierungsgehaltes einzelner Regionen eröffneten (Mahler et al., 1977; Cabral et al., 1977; Wachter et al., 1977; Claisse et al., 1977; van Ommen et al., 1977).

Anstelle einer weitergehenden Kartierung des gesamten mitochondrialen Genoms erschien es daher von größerem Interesse, eine dieser Regionen auszuwählen und ihre Genomorganisation biochemisch zu charakterisieren. Am besten geeignet erschien die COB/BOX Region, da i) zahlreiche mit⁻Mutanten innerhalb der COB Region kartiert waren, deren Mutationsorte in zwei (Tzagoloff et al., 1976b; Schweyen et al., 1977) bzw. sechs (Kotylak und Slonimski, 1977b) voneinander getrennten Klustern lokalisiert werden konnten ii) zwei voneinander getrennte Sequenzen innerhalb der COB Region mit einer 18 S RNS hybridisierten (Van Ommen et al., 1977) und iii) Modifikationen von Translationsprodukten von mit⁻cob⁻Mutanten zu der Annahme führten, daß sogar drei genetische Loci als strukturelle(s) Gen(e) für das oder die Apocytochrom b Polypeptide codieren (Claisse et al., 1977). Die Voraussetzungen für eine Feinanalyse waren durch eine Reihe von rho⁻Stämmen gegeben (Schweyen et al., 1977), die für Teile der COB-Region oder ganz COB codieren. Mit Hilfe dieser kartierten rho⁻Klone sollte es möglich sein, genetische Marker einer physischen Karte zuzuordnen

und damit eventuell Aussagen über den Aufbau mitochondrialer Gene treffen zu können.

Mit der in Teil 1 vorgestellten Methodik können Längenangaben von Abständen genetischer Marker nur im Prozentbereich des Wt-Genoms gegeben werden. Außerdem wird mit Hybridisierungsanalysen nicht erkannt, wenn einzelne rho⁻ Mutanten interne Deletionen enthalten oder aus heterogenen Populationen bestehen. Es bleibt ebenso unerkannt, welche Reiterationsform innerhalb eines rho⁻ Klonen vorliegt (siehe 7.2.). Das kann durch unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens eines bestimmten Markers (Heyting et al., 1979a) zur ungenauen Kartierung eines kleinen Bereiches - wie der COB Region - führen. Um solche Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurden die folgenden Versuche mit Hilfe von Restriktions- und Hybridisierungsanalysen einzelner DNS-Fragmente durchgeführt.

7. Restriktionsanalysen der DNS aus rho⁻ Klonen

Rho⁻ Stämme haben einen mehr oder weniger großen Teil des mitochondrialen Genoms verloren. Die zurückbehaltene Sequenz wird bis zur ursprünglichen Länge des Wildtyp-Genoms amplifiziert.

7.1. Möglichkeiten der Reiteration

Für die Reiteration der DNS einer bestimmten rho⁻ Mutante gibt es im idealen Fall zwei Möglichkeiten:

1. Tandem Anordnung:

Als "tandem" wird eine Reiteration "klmn klmn" verstanden; dabei wird immer die gleiche Richtung der Sequenz "klmn"

beibehalten (siehe schematische Darstellung in Abb.10a).

2. Palindrome Anordnung:

Als "palindrom" wird eine Reiteration "klmn nmlk" verstanden; dabei wird die Sequenz "klmn" alternierend in gegenläufige Richtung wiederholt (siehe Abb. 10b).

7.2. Identifizierung der Reiterationen der DNS einzelner rho⁻Klone

Auf welche Art eine rho⁻DNS angeordnet ist, läßt sich im Vergleich zum Wildtyp durch Spaltung mit jeweils einem Restriktionsenzym nachweisen. Je nach der Häufigkeit, mit der das Enzym die rho⁺DNS spaltet, und abhängig von der Länge der in der rho⁻DNS zurückgehaltenen Sequenz sind eine bis mehrere Restriktionsbanden der rho⁻DNS mit Wildtypbanden identisch. Tritt zusätzlich zu den rho⁺Banden nur noch eine zusätzliche Bande auf, so sind die DNS-Sequenzen in der rho⁻DNS tandem reiteriert. Diese zusätzliche Bande ("junction fragment") setzt sich aus den beiden Randbereichen der rho⁻DNS zusammen (siehe Abb. 10c und Abb. 11). Liegt die zu untersuchende rho⁻DNS in palindromer Form vor, so sind zwei zusätzliche Banden zu sehen. Jede dieser Banden besteht aus einem Randfragment der rho⁻DNS in jeweils doppelter Länge (siehe Abb. 10d und Abb. 12b). Wird eine rho⁻DNS von einem Restriktionsenzym nur einmal gespalten, so ergibt sich für den Fall der tandem Reiteration nur eine einzige Bande, die kein Originalfragment darstellt und deren Länge dann der Länge des zurückgehaltenen DNS-Fragments entspricht. Eine palindrom reiterierte rho⁻DNS dagegen zeigt zwei Fragmente, die keine Originalfragmente sind

und deren Längen addiert dem Doppelten der Länge des zurückbehaltenen Fragmentes entsprechen. Ist die Reihenfolge der Wt-Restriktionsfragmente innerhalb einer bestimmten Region bekannt, kann bei einer palindrom reiterierten rho⁻ auf Grund der zwei verschieden langen, zusätzlich auftretenden Restriktionsbanden die Orientierung dieser Fragmente festgelegt und damit die DNS-Sequenz lokalisiert werden. Es kann jedoch auch der Fall eintreten, daß eine rho⁻DNS von dem verwendeten Enzym nur einmal, und zwar in der Mitte geschnitten wird. Dann würde sich sowohl bei tandem als auch bei palindromer Reiteration nur ein einziges Fragment ergeben. Um die Konfiguration solch einer rho⁻DNS bestimmen zu können, müssen Analysen mit mehreren anderen Restriktionsenzymen durchgeführt werden (z.B. BD4; vgl. Photo 11c).

7.3. Identifizierung nicht "idealer" rho⁻Klone

Die oben dargestellten Beispiele gelten nur für "ideale" rho⁻Mutanten; d.h. für rho⁻Stämme, die homogen sind in Bezug auf ihre zurückbehaltene Sequenz und die durch eine einzige, zusammenhängende Deletion des Wildtypgenoms entstanden sind. Es gibt auch "stabile" rho⁻Klone, die eine zweite oder interne Deletion tragen. Diese rho⁻Mutanten würden eine Restriktionsanalyse sehr erschweren, können jedoch durch die vorhergehende, genetische Feinkartierung in den meisten Fällen ausgeschlossen werden (Bolotin-Fukuhara et al., 1976). Innerhalb der COB-Region sind zahlreiche Mutationsorte kartiert, so daß gerade in diesem Bereich solche internen Deletionen sehr selten genetisch unerkannt bleiben. Viel

schwerer ist es, heterogene rho⁻Populationen, d.h. rho⁻ Stämme, die zum Teil noch Subklone enthalten und/oder zusätzlich zur tandem Reiteration noch palindrome Reiteration aufweisen, von der Analyse auszuschließen. Bei der Restriktionsanalyse solcher rho⁻Klone treten Banden in offensichtlich substöchiometrischen Mengen auf (Abb. 12d,e). Da diese Banden kaum zu identifizieren sind, ist eine Analyse solcher rho⁻Stämme schwierig und wird in den meisten Fällen nicht weiter verfolgt.

8. Längenbestimmung mitochondrialer Restriktionsfragmente

Bei der Längenbestimmung mitochondrialer DNS-Fragmente sind einige Abweichungen im Gegensatz zu Längenbestimmungen anderer DNS-Spezies zu beachten. In der Elektrophorese mit Agarose bzw. Polyacrylamid als Trägersubstanz werden Nukleinsäuremoleküle sowohl nach ihrer Größe, ihrer Konfiguration, als auch nach ihrer Ladung aufgetrennt. Da mitochondriale DNS aus *Saccharomyces* sehr AT-reich ist (82%) und AT- wie GC-reiche Sequenzen in Klustern vorliegen (Prunell und Bernardi, 1977), können sich im Vergleich zu DNS-Fragmenten bekannter Größe (Marker-DNS, z.B. P22 DNS, EcoRI gespalten; ØX 174 DNS, HaeIII gespalten) Unterschiede im Laufverhalten ergeben, die dann zu Ungenauigkeiten bei der Größen- bzw. Längenbestimmung führen. Deshalb wurde EcoRI-gespaltene P22 und Kl14-4A Wt-DNS nebeneinander in einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt (Abb. 11d,e). Mit den bekannten Fragmentlängen der P22/EcoRI Restriktion wurde eine Eichkurve erstellt, die EcoRI Fragmentlängen der rho⁺ DNS daraus bestimmt und mit den von Sanders et al., 1977,

errechneten Werten verglichen. Diese Arbeitsgruppe arbeitete mit 0,5% bzw. 0,75%igen Agarosegelsystemen und verwendete λ -Phagen-DNS als Marker.

Wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, stimmen die beiden Längenbestimmungen gut überein. Deshalb wurden im folgenden für große Fragmente (900 - 12000 Bp) 0,7% Agarosegele benutzt, mit EcoRI gespaltener ρ^+ oder P22 DNS als Marker. Bei der später zu beschreibenden Feinanalyse wurden 1,5% Agarosegelsysteme verwendet, mit ϕ X174/HaeIII allein oder P22 /EcoRI + ϕ X 174/HaeIII als Marker-DNS. Die Eichkurven der beiden DNS-Spezies verlaufen in dem Molekulargewichtsbereich parallel, den sie beide überdecken, und lassen sich deshalb zu einer Eichkurve verbinden, die sich dann auf den gesamten Bereich von 100 - 4000 Bp erstreckt (siehe Abb. 13 und Abb. 14). Auf Abweichungen bei der Längenbestimmung zwischen den beiden Gelsystemen (0,7 und 1,5%) und Angleichungen an die Daten anderer Restriktionskarten (z.B. Slonimski et al., 1978a) soll später eingegangen werden.

9. "Nick Translation"

9.1. Theorie der "Nicktranslation"

Die physische Kartierung der COB-Region sollte nicht nur mit Restriktions-, sondern auch mit Hilfe von Hybridisierungsanalysen durchgeführt werden. Um hochspezifisch markierte DNS zu erhalten, verwendeten Kelly et al., 1970, und Rigby et al., 1977, die Methode der "Nick Translation". Die hohe Spezifität der markierten DNS ist notwendig für

RNS/DNS und DNS/DNS Hybridisierungsexperimente, bei denen DNS-Restriktionsfragmente und auch später RNS-Spezies erkennbar gemacht werden sollen, die mit Hilfe anderer, z.B. Färbemethoden, nicht zu identifizieren sind. Hierbei wird die Fähigkeit der E.coli DNS Polymerase I genutzt, eine Reparatursynthese durchzuführen. DNS-Moleküle, die kein freies 3'Hydroxylende besitzen, können nicht als "primer template" für die DNS-Synthese mit diesem Enzym verwendet werden. Deshalb müssen bei den meisten DNS-Spezies Einzelstrangbrüche in vitro herbeigeführt werden, z.B. durch Zugabe von DNasen. Es ist sehr vorteilhaft, daß mitochondriale DNS aus Sacch.cer. bereits interne "nicks" enthält (siehe Teil 1), und es schien deshalb nicht notwendig, zusätzliche Einzelstrangbrüche durch DNase herbeizuführen.

9.2. Durchführung der Reparatursynthese

Die mtDNS, die als "template-primer" in der "Nick Translation" eingesetzt werden sollte, wurde vorher in einem Restriktionsexperiment überprüft, ob sie vollständig spaltbar und frei von Zwischenbanden war, die durch Kontamination von Kern-DNS verursacht werden. In anderen Fällen wurde DNS aus einzelnen Restriktionsfragmenten eluiert und dann in der "Nick Translation" eingesetzt. Die DNS-Menge variierte von 0,1 - 1 µg pro Versuchsansatz. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Rigby et al., 1977, ist das Maximum des Einbaus radioaktiver Nukleotide schon nach 60 - 90 min erreicht (siehe Abb. 15). Bei Desoxynukleosid-³²P-triphosphaten mit der spezifischen Aktivität von 350 Ci/mmol als Substrat wurde eine spezifische Aktivität

der markierten DNS von $1,5 - 2 \times 10^7$ cpm/ μ g DNS erreicht, mit spezifisch höher markierten Triphosphaten eine Aktivität von $4 - 8 \times 10^7$ cpm/ μ g DNS. Die spezifischen Aktivitäten liegen zwar etwas niedriger als die von Rigby et al., 1977, für SV 40 DNS angegebenen, sind jedoch für die hier durchzuführenden Analysen ausreichend.

9.3. Abtrennung der radioaktiven DNS von nicht eingebauten Triphosphaten

Die nicht eingebauten Triphosphate wurden über eine Sephadex G-50 Säule von der radioaktiven DNS getrennt und die Radioaktivitäten der einzelnen Fraktionen bestimmt (Abb.16). Das erste Maximum der Kurve sollte die radioaktive DNS enthalten. Als Kontrolle dazu wurden je 5 μ l dieser Fraktionen und der drei folgenden entnommen und auf einem Agarosegel elektrophoretisiert. Aus der Autoradiographie ist zu ersehen (Abb.17), daß i) die Hauptmenge der DNS in den Fraktionen des ersten Maximums zu finden ist und ii) im Vergleich zum P22/EcoRI Marker diese dem ursprünglichen Molekulargewicht der mtDNS von ca. 50×10^6 Dalton entspricht.

9.4. Nachweis der durchgehend gleichmäßigen Markierung

Wenn "nick translatierte" DNS in quantitativen Hybridisierungsversuchen eingesetzt werden soll, muß gewährleistet sein, daß die DNS durchgehend gleichmäßig markiert worden ist. Um das nachzuweisen, wurde rho⁻ DNS mit einer Restriktionsnuklease gespalten, dann ".ck

translatiert" und 5 μ l der markierten DNS im Agarosegel aufgetrennt. Die Autoradiographie davon wurde mit der Photographie eines Geles verglichen, auf dem dieselbe DNS, ebenso restringiert, aber unmarkiert aufgetrennt worden war. Für die "nick translatierte" DNS ergab sich dasselbe Restriktionsmuster wie für die noch unmarkierte DNS und zwar in der gleichen Intensität der Bandenschwärzung. Damit war nachgewiesen, daß auch in diesem, DNase freien, "Nick" Translationssystem die DNS gleichmäßig markiert wird, wie es von Rigby et al., 1977, für SV 40 DNS beschrieben wurde.

10. Eingrenzung der COB Region

10.1. Maximale Länge der COB Region

Im Juli 1977 lagen genaue Restriktionskarten des gesamten mitochondrialen Genoms vor, und zwar für die Stämme KL14-4A, J31-3D (Sanders et al., 1977) und für MH41-7B, MH32-13D (Morimoto et al., 1975) von *Sacch. cer.*. Aus dem Vergleich der Karten untereinander ergaben sich zum Teil wesentliche Unterschiede. Deshalb war zunächst zu klären, ob die Wildtypstämme KL14-4A, RM590-9D und RM511-4A, aus denen die im Vorstehenden genannten ρ^- Klone isoliert waren, sich in ihrem Restriktionsmuster gleichen. Nur dann können alle ρ^- Stämme gemeinsam für eine Feinkartierung verwendet werden.

Bei der Restriktion mit EcoRI ergaben sich die gleichen Banden für alle drei Wildtypstämme (Abb. 11e und 18); auch in einer Dreifachrestriktion mit HindII, HindIII und BamHI zeigen RM590-9D und RM511-4A dieselben Fragment-

größen, wie sie von Sanders et al., 1977, für KL14-4A bestimmt wurden. Da EcoRI alle drei Wildtypen in 9 Fragmente spaltet, die Dreifachrestriktion sogar 16 Banden ergibt, die für die drei Stämme identisch sind, kann davon ausgegangen werden, daß die Basensequenz der mitochondrialen DNS von KL14-4A, RM590-9D und RM511-4A weitgehend dieselbe ist.

Um COB auf dem Gesamtgenom zu lokalisieren und soweit wie möglich einzugrenzen, sollte zuerst bestimmt werden, in welchen Wt-Restriktionsfragmenten die für das Apocytochrom b codierende Region enthalten ist. Dafür wurden mehrere rho⁻ Stämme ausgewählt, die jeweils die äußersten genetischen Marker der COB Region noch enthalten, nicht aber die beiden an den Flanken der COB Region liegenden Oligomycin-Resistenz-Marker Oli 1 und Oli 2. Aus diesen rho⁻ Klonen wurde die mtDNS isoliert und für Restriktionsanalysen benutzt. Zwei Beispiele sind in Abb.19 und 11a dargestellt: Mit Endonuklease EcoRI wird die mtDNS der beiden rho⁻ Stämme dD22 und S1 in zwei Fragmente gespalten, jeweils eines entspricht der rho Bande 6. Diese RR6 genannte Bande wird in der Doppelrestriktion mit EcoRI + HindIII in zwei kleinere Wt-Fragmente gespalten, DR9 und RD12 (Nomenklatur nach Sanders et al., 1977). Die Größe der "junction" Bande variiert bei den untersuchten rho⁻ Klonen von 7600 - 14000 Bp. Da dD22 diejenige rho⁻ mit dem kleinsten Molekulargewicht ist (11000 Bp), wurde nur dieser rho⁻ Stamm weiter untersucht und die mtDNS von dD22 in Einfach- oder Mehrfachrestriktion mit folgenden Enzymen gespalten:

EcoRI, BamHI, HindII, HindIII.

In Abb.20 und 21 sind die Gele dargestellt, in Tabelle 6a die auftretenden Banden mit ihrem Molekulargewicht angegeben. Zu den mit dem Wt parallel laufenden Banden ist die Nomenklatur von Sanders et al.,1977, verwendet. Daraus ist zu ersehen, daß dD22 die ρ^+ Fragmente EcoRI (RR6), BamHI (BB5) und die HindII Bande 5 (TT5) enthält, denn alle drei Banden lassen sich mit anderen Enzymen in Wt-Fragmente auftrennen. Zusätzlich tritt immer eine "junction" Bande auf, wie es nicht anders für eine tandem reiterierte ρ^- zu erwarten ist. Bei allen Restriktionsanalysen jedoch, bei denen HindII beteiligt ist, entsteht ein "junction" Fragment, das nicht lokalisiert werden kann, da keine Restriktionsstellen im Abstand von ca. 4000 Bp von TT5 und RR6 entfernt, bekannt waren. Hybridisierungsanalysen sollten Aufschluß darüber geben, in welche Richtung das "junction" Fragment dieser ρ^- zu legen ist. Dazu wurde ρ^+ DNS mit den verschiedenen oben genannten Enzymen gespalten, mit Hilfe der "Southern Technik" auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit "nick translatierter", ^{32}P markierter dD22 DNS hybridisiert. Einige dieser "Southern blots" sind in Abb.22 dargestellt und alle Ergebnisse ergänzend zu den Restriktionsdaten in Tabelle 6b zusammengefaßt. Dabei wird deutlich, daß dD22 mit allen Wt-Banden hybridisiert, die innerhalb der Banden RR6, BB5 oder TT5 liegen. Ebenso deutlich ist die Hybridisierung mit den in Richtung Oli 1 lokalisierten Fragmenten, ge-

ringer dagegen mit den in Richtung Oli 2 gelegenen. Ein kleiner Teil des "junction" Fragmentes von dD22 wird also nach Oli 2, der größte Teil aber in Richtung Oli 1 reichen. Aus den Restriktions- und Hybridisierungsdaten kann die folgende Karte erstellt werden, die eine Lokalisierung der COB Region auf dem Wildtypgenom und ihre maximale Größe darstellt (Abb.23). Da die Lage des "junction" Fragmentes nur annähernd, aber nicht genau bestimmt werden konnte, ist es hier gestrichelt eingezeichnet.

10.2. Minimale Länge der die COB Region enthaltenden Sequenz

Weil der Abstand von COB zu Oli 1 recht groß sein kann (siehe Teil 1; Grivell et al., 1978, : 400 - 4000 Bp), schien es wahrscheinlich, daß die für Apocytochrom b codierende Region kleiner ist als die im Stamm dD22 als repetitive Einheit vorliegende Sequenz. Deshalb sollte versucht werden, mit Hilfe dreier ρ^- Klone, die nur Teile dieser Region enthalten, die minimale Ausdehnung der COB Region zu bestimmen.

In Abb.24a ist eine vereinfachte genetische Karte von COB dargestellt (Schweyen et al., 1977). Darunter ist das jeweilige mtDNS Segment dreier ρ^- Mutanten eingezeichnet: BD4 enthält die Sequenz innerhalb der mit $^-$ Marker 2494 und 2011, ρ^- MM1A9 1354 bis 2590 und ρ^- A11 (Slonimski et al., 1978a) Marker 4881 bis 1625. Mit Ausnahme der beiden randständigen Marker 4434 und 4457 ist damit die gesamte COB Region erfaßt. Für die DNS des ρ^- BD4

wurden Restriktionen mit allen auch für die DNS aus ρ^- dD22 verwendeten Nukleasen und zusätzlich dazu Hybridisierungsanalysen mit ρ^+ Fragmenten durchgeführt (Abb.11c; 12f,g; 20c; 25).

Die Restriktionsanalyse der mtDNS von Stamm A11 beschränkt sich auf Anwendung von BamHI und HindII, des Stammes MM1A9 auf HindII und zusätzlich HaeIII (Restriktionskarte: Słonimski et al., 1978a). Die Daten sind in Tabelle 6 c-f dargestellt.

Das Elektrophoresemuster der DNS von Stamm BD4 zeigt zwei Wt-Fragmente: EcoRI-HindIII (RD12) und EcoRI-BamHI (BR11). Die EcoRI Spaltstelle liegt genau in der Mitte der DNS-Sequenz, so daß sich erst beim Spalten mit anderen Enzymen zeigte, daß die DNS von BD4 palindrom reiteriert und ihre Lage genau zu bestimmen ist (siehe 7.2.).

ρ^- A11 enthält die Restriktionsstelle für BamHI und HindII, damit also Wt-Fragment TB11. Da die DNS dieses ρ^- Stammes tandem reiteriert vorliegt, kann zwar die Länge, aber nicht die Lage des "junction" Fragmentes exakt angegeben werden.

ρ^- MM1A9 enthält das kleine Originalfragment zwischen HindII und HaeIII, zeigt in der Einzel- wie in der Doppelspaltung zwei "junction" Banden; die DNS dieses ρ^- Stammes ist somit palindrom orientiert und ihre Lage genau zu bestimmen. Die Restriktionsanalysen sind hierbei auf Grund des geringen Molekulargewichtes der entstehenden Fragmente in 1,5%igen Agarosegelen durchgeführt worden.

In Abb.24b ist die Restriktionskarte der COB Region und

die Lokalisierung der ρ^- Klone dargestellt. Aus diesen Daten läßt sich eine minimale Größe der COB Region von ca. 7000 Bp bestimmen.

11. Die COB Region - ein Mosaicogen

Wie im Teil 10.2. beschrieben, entspricht die COB Region mindestens einer Länge von 7000 Bp. Das Apocytochrom b hat ein Molekulargewicht von 30 Kilodalton, was nur ein Siebentel der oben genannten DNS-Länge für seine Codierung notwendig macht. Um diese Divergenz zu erklären, muß zunächst auf biochemische und genetische Ergebnisse eingegangen werden, die zur gleichen Zeit mit den im obigen Abschnitt beschriebenen erzielt wurden:

- Mit Hilfe zahlreicher mitochondrialer Mutanten, denen ein funktionsfähiger bc_1 Komplex fehlt, wurde durch Deletions- und Rekombinationskartierung eine genetische Feinkarte der COB Region erstellt (Schweyen et al., 1977).
- Es wurde nachgewiesen, daß die Mutationsorte innerhalb der COB Region in verschiedene Gruppen (Kluster) eingeteilt werden können, die im Rekombinationstest untereinander ungekoppelt erscheinen (Kotylak und Slonimski, 1977b).
- Der überwiegenden Mehrzahl der COB-Mutanten fehlt das ursprüngliche 30000 Apocytochrom b Genprodukt. Statt dessen treten andere Proteine mit einem kleineren Molekulargewicht auf. Einige dieser Proteine sind durch proteolytische "fingerprint" Analysen und mit immunologischen Versuchen als Fragmente des Apocytochrom b identifiziert worden (Haid et al., 1979; Bechmann, pers.).

Mitteilung).

- Das Molekulargewicht dieser Fragmente ist ohne Ausnahme mit der Position des Mutationsortes der Mutanten innerhalb der genetischen Karte korrelierbar: Es nimmt in der Richtung Oli 2 $\rightarrow$ Oli 1 zu. Die damit nachgewiesene, bei weitem überstatistische Colinearität der genetischen Karte mit der Länge der Apocytochrom b-Fragmente ist ein klarer Beweis für die Codierung eines einzigen Apocytochrom b Polypeptids durch die COB-Region.
- Die Loci der Mutanten, die solch ein Verhalten bezüglich ihrer Genprodukte zeigen, bilden Kluster mit enger Kopplung.
- Diese Regionen, α bis ϵ benannt, werden durch Kluster von Mutationsorten unterbrochen, welche zu pleiotropen Phänotypen führen. Viele von ihnen sind konditional und zeigen zusätzlich ein Fehlen der Untereinheit I der Cytochrom Oxidase. Sie erzeugen eine größere Zahl abnormer Translationsprodukte, deren Molekulargewichte nicht colinear zum Mutationsort der betreffenden Mutante sind (Haid et al., 1979).

Die Daten sind in Abb. 26 zusammengefaßt (nach Kreike et al., 1979; Bechmann, persönliche Mitteilung).

Mit α - ϵ = Exons werden die Kluster bezeichnet, deren Mutanten Genprodukte mit colinear zur genetischen Karte ansteigenden Molekulargewichten hervorbringen. Für die dazwischen liegenden Sequenzen $I\alpha\beta$ - $I\epsilon$ = Introns oder "intervening sequences" sind entweder keine Mutationsorte bekannt oder die dort kartierenden Mutanten haben keine co-

linearen Genprodukte.

Diese Daten beweisen: Die COB-Region ist mosaic. Die Kluster $\alpha - \epsilon$ enthalten codierende Sequenzen für das Apocytochrom b. Diese Sequenzen sind unterbrochen durch Regionen der mtDNS, deren Funktion bis jetzt noch unbekannt ist. Die Interpretation der COB-Region als "split gene" wird durch Heteroduplex-Studien bekräftigt (Arnberg et al., unveröffentlicht). Hybride zwischen Restriktionsfragmenten der DNS mit dem RNS-Transkript zeigen einzelsträngige DNS-"loops", was darauf hinweist, daß das RNS-Transkript benachbarte Sequenzen enthält, die auf der DNS weit entfernt liegen. Die auf Proteinebene erhaltenen Daten - in Zusammenhang mit der Genetik und den Heteroduplex-Studien - können indirekt das Phänomen der "viel zu langen" DNS erklären, die für Apocytochrom b codiert.

11.1. Nachweis der Mosaicgen-Struktur der COB-Region auf DNS-Ebene

Direkte Aussagen darüber, daß codierende Regionen, z.B. $\alpha + \epsilon$, nicht nur im Rekombinationstest genetisch ungekoppelt, also voneinander relativ weit entfernt erscheinen, sondern auch beträchtliche physische Abstände diese Kluster trennen, können durch Untersuchungen der DNS selbst erbracht werden - im vorliegenden Fall mit Hilfe von Restriktionsanalysen.

Die im Abschnitt 10.2. dargestellten Daten lassen hierfür folgende Aussagen zu (vgl. Abb. 24b): rho⁻A11 enthält Teile des Exons α und das gesamte Exon β ; rho⁻MM1A9 enthält

σ und Teile von $\mathcal{E}$. Die beiden außenständigen Marker dieser rho⁻Klone gehören codierenden Bereichen an. Da als gesichert angesehen werden kann, daß die COB-Region ein Polypeptid von 30 Kilodalton codiert, und dafür eine DNS-Sequenz von maximal 1000 Bp ausreichend ist, wird mit dem oben genannten Ergebnis nachgewiesen, daß codierende Sequenzen durch insgesamt mindestens 6000 Bp lange Bereiche getrennt sind.

12. Feinstkartierung der COB Region

Um genaue Aussagen über die Mosaikogen-Struktur der COB Region treffen zu können, sollte im folgenden versucht werden, mit Hilfe der Restriktionskartierung einzelner rho⁻Mutanten, die nur noch kleine Teile der COB-Region zurückbehalten haben, die molekularen Größen der einzelnen codierenden Sequenzen (Exons $\alpha - \mathcal{E}$) bzw. der dazwischenliegenden Regionen (Introns $\alpha\beta - \sigma\mathcal{E}$) zu bestimmen und ihre Lage der genetischen Karte zuzuordnen. Dafür war es notwendig, die Restriktionskarte zu verfeinern.

12.1. HpaII Karte

Von vielen zur Verfügung stehenden Restriktionsendonukleasen wurde ein Enzym (HpaII) gewählt, welches das gesamte mitochondriale Genom in ca. 80 Fragmente spaltet (Bernardi et al., 1976 und Abb. 27). Um die Aufstellung einer Restriktionskarte für alle rho⁺ Fragmente zu vermeiden, wurde dD22 mtDNS mit HpaII gespalten und versucht, die entstehenden 10 Fragmente zu ordnen (Abb. 27). 9 der 10 Banden des

"tandem" reiterierten ρ^- Stammes dD22 entsprechen ρ^+ Banden, welche die vollständige COB-Region enthalten.

12.1.1. Lokalisierung der Bande 2

Das HpaII Restriktionsmuster der DNS von ρ^- BD4 wurde mit dem von dD22 verglichen (Abb. 28). Bande 2 und Bande 9 von dD22 sind auch in BD4 enthalten, müssen also Originalfragmente sein und nebeneinander liegen. Als nächstes wurde die DNS von BD4 mit EcoRI gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt, die EcoRI Bande aus dem Gel extrahiert (vgl. Material und Methoden), mit HpaII nachgespalten und erneut elektrophoretisch aufgetrennt.

Abb. 29 zeigt die Elektrophorese im Vergleich zum ρ^+ und zum HpaII restringierten BD4 ohne vorherige EcoRI Behandlung. Das Original-Fragment 2 wird durch EcoRI nachgespalten; 2 neue Banden (670 und 540 Bp) treten auf, die Addition der zwei Fragmente ergibt die Länge der Bande 2. Eine HpaII Schnittstelle liegt also 670 Bp, die zweite 540 Bp von der EcoRI Stelle entfernt.

Um die Orientierung der beiden Schnittstellen herauszufinden, wurde dD22 DNS zuerst mit EcoRI gespalten, die DNS der beiden resultierenden Banden extrahiert, mit HpaII nachgespalten und in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Aus Abb. 30(a-d) ist zu ersehen, daß auch hierbei Bande 2 durch EcoRI gespalten wird, wobei die neuauftretende 670 Bp Bande im "junction fragment" der dD22 DNS und die 540 Bp Bande im EcoRI Fragment 6 erscheint. Damit sind zwei Restriktionsstellen von HpaII festgestellt.

12.1.2. Lokalisierung der Bande 9

Die DNS von rho⁻BD4 enthält noch die Original-Bande 9. Diese tritt bei der Nachspaltung von Fragment RR6 mit HpaII wieder auf (Abb. 30). Bande 9 muß also im RR6 Fragment liegend direkt an Bande 2 anschließen.

12.1.3. Lokalisierung der Bande 3

Das an Bande 9 angrenzende Fragment konnte auf drei verschiedene Arten lokalisiert werden:

1. Bande 3 wird in der Doppelspaltung mit HpaII und HindIII in 2 Fragmente von 1010 und 180 Bp gespalten.
2. Rho⁻MM1A11 wurde für die Analyse hinzugezogen. Die DNS dieser rho⁻ ergab mit HindII ein Fragment von 780 Bp (Abb. 31a). Da diese rho⁻ genetische Marker des Exons 3 zurückbehalten hat, konnte es sich nur um die im RR6 liegende HindII Spaltstelle handeln. Nach Extraktion des 780 Bp Fragmentes aus dem Gel wurden beim Nachspalten mit HpaII 2 neu auftretende Fragmente erhalten; 130 und 650 Bp lang (Abb. 30e).

Im Abstand von 130 oder 650 Bp von HindII entfernt muß also eine Restriktionsschnittstelle für HpaII gelegen sein. Es ergeben sich 4 Möglichkeiten für die Lage der HpaII Spaltstelle (130 oder 650 Bp links bzw. rechts von der HindII Spaltstelle). Das einzige Fragment, dessen Lokalisierung angrenzend an Bande 9 mit einer der 4 Möglichkeiten in Einklang gebracht werden kann, ist das auch innerhalb von RR6 auftretende Fragment 3.

3. Die DNS von rho⁻MM1A9 ergibt in der Doppelspaltung mit HaeIII und HpaII 2 Banden. Eine davon ist sehr klein (70 Bp, Abb. 31b). Da die HpaII Stelle nur 130 oder 650 Bp von der HindII Spaltstelle entfernt sein kann, muß die HpaII Schnittstelle in dem HindII/HaeIII Fragment liegen. Damit kann nur Bande 3 an Bande 9 angrenzen.

12.1.4. Lokalisierung der Banden 5a und 6

Zwei im EcoRI Fragment auftretende HpaII Banden sind noch zu lokalisieren: Banden 5a und 6.

Wenn Fragment 6 mit 480 Bp an Fragment 3 angrenzte, müßte es in der DNS von rho⁻MM1A9 enthalten sein, da sie 540 Bp von der HpaII- aus in Richtung BamHI Stelle reicht. Sie weist aber nur eine HpaII Schnittstelle auf. An Fragment 3 kann also nicht Fragment 6, sondern muß Fragment 5a anschließen.

Fragment 6 wird damit durch eine Restriktionsstelle begrenzt, die kurz vor der EcoRI Stelle gelegen ist, da alle im RR6 Fragment gefundenen Subfragmente geordnet werden konnten und kein "junction" Fragment übrig blieb.

Innerhalb des EcoRI Fragmentes 6 konnte die Reihenfolge der HpaII Fragmente bestimmt werden, und zwar von rechts nach links: 2 - 9 - 3 - 5a - 6. Im folgenden soll versucht werden, die Reihenfolge im EcoRI "junction" Fragment festzulegen.

12.1.5. Lokalisierung der Bande 1

Durch Doppelrestriktion mit HpaII und BamHI wurde die Ban-

de 1 in zwei neue Banden gespalten, von 2800 und 1150 Bp Länge. Damit liegt die BamHI Stelle innerhalb von Fragment 1, das damit an Fragment 2 angrenzt.

Da die COB-Region innerhalb der EcoRI-($\rightarrow$ OLI 1) und der HpaII Spaltstelle ($\rightarrow$ OLI 2) gelegen ist (siehe Abb. 24b), sind die restlichen HpaII Fragmente (4,5b,7,8,10) nicht in der COB Region lokalisiert. Deshalb soll hier ihre Reihenfolge auch nicht bestimmt werden.

Aus den dargestellten Daten läßt sich eine HpaII Karte der COB Region konstruieren, in der auch einige der vorher schon verwendeten Restriktionsstellen - EcoRI, HindII, HindIII, HaeIII (eine), BamHI - angegeben werden können (Abb. 32a). Daraus resultieren für die in Abb. 24b bestimmten Fragmentgrößen, die auch von Sanders et al. (1977) angegeben wurden, in diesem 1,5% Agarosegelsystem etwas höhere Werte (vgl. Tab. 7).

12.2. HaeIII Karte

Es sollte versucht werden, die von Slonimski et al. (1978a) innerhalb der COB-Region geordneten Restriktionsstellen für das Enzym HaeIII in das hier verwendete 1,5% Agarosegelsystem zu übertragen, um die oben erarbeitete Restriktionskarte so zu verfeinern, daß auch rho⁻Klone lokalisiert werden können, deren repetitive DNS-Sequenz sehr kurz ist. Dazu wurde die DNS der rho⁻dD22 und BD4 mit HaeIII gespalten und vergleichend zur Restriktion mit HpaII im 1,5% Agarosegel aufgetrennt (Abb 33).

Die Längen der resultierenden Fragmente wurden bestimmt und

mit den von Slonimski et al. (1978a) angegebenen verglichen. Zwei der Fragmente von ρ^- BD4 entsprechen den ρ^+ Fragmenten (Nr. 6,7), das sind Nr. 7,8 in der oben angegebenen Publikation. Auf Grund dieser Gemeinsamkeiten scheint es gerechtfertigt, die Reihenfolge der HaeIII Fragmente als gegeben anzunehmen und bei der einen schon festgelegten HaeIII Stelle beginnend die übrigen Spaltstellen mit den in diesem System gefundenen Längen linear anzuordnen (Abb. 32b).

Die resultierende HaeIII Karte wird durch Nachspalten des Fragmentes 6 (780 Bp) mit EcoRI und durch die Lokalisierung des palindrom angeordneten Genomsegments der ρ^- BD4 bestätigt.

Die HaeIII Spaltstellen können nun in die gegebene Karte (Abb. 32a) übertragen werden; zusätzlich wird die HindII Stelle übernommen (Bp in 0,6% Agarosegel $\times$ Faktor 1,06 $\hat{=}$ Bp nach der Berechnung von Slonimski et al., 1978a). Die vollständige Restriktionskarte ist in Abb. 32c aufgezeichnet.

13. Lokalisierung der DNS von ρ^- Mutanten durch Restriktionsanalysen

Mit Hilfe der nun geordneten Restriktionsfragmente war es möglich, die repetitive DNS-Sequenz einiger genetisch kartierter ρ^- Stämme zu lokalisieren, die nur Teile der COB Region enthalten. (In Zusammenarbeit mit C. Schmelzer durchgeführt.)

In Tabelle 8 und Abb. 34 sind alle verwendeten ρ^- Klone

aufgeführt; die Länge ihrer DNS und die Zahl der vorhandenen Restriktionsstellen ist dazu angegeben.

Die Lokalisierung erfolgte mit Hilfe von i) ρ^+ Fragmenten, die ebenfalls bei der Restriktionsanalyse der DNS verschiedener ρ^- Stämme auftreten; ii) einigen ρ^- Mutanten gemeinsamen oder nicht gemeinsamen genetischen Markern und iii) einem 210 Bp langen Restriktionsfragment, das bei der Spaltung mit AluI entsteht; es konnte im BamHI-HindII Fragment 500 bis 650 Bp von der BamHI Spaltstelle entfernt lokalisiert werden (Abb.35).

Beispiel zu ii) und iii) für die Lokalisierung von ρ^- B2 und A19:

Die mtDNS von ρ^- B2 enthält eine 2800 Bp lange Sequenz, die, festgelegt durch eine BamHI, eine EcoRI und eine einzige HaeIII Spaltstelle, maximal bis zur 150 Bp von der EcoRI entfernten HaeIII Schnittstelle reichen kann. Die mtDNS von ρ^- A19 hat nur eine BamHI Spaltstelle behalten; die Orientierung der bei der Restriktion mit BamHI entstehenden Banden ist damit nicht zu bestimmen (375 und 840 Bp; palindrome Reiteration). Die Lage der Fragmente ist festgelegt durch: i) die gemeinsamen Marker von B2 und A19, ii) das 210 Bp AluI Fragment, das ρ^- A19 gemeinsam hat mit ρ^- B1, A15 und A11, das aber nicht bei der AluI-Spaltung der DNS von ρ^- B2 entdeckt werden kann.

14. Zuordnung der codierenden Sequenzen (Exons) der COB Region zu der Restriktionskarte mit Hilfe genetisch charakterisierter ρ^- Mutanten

Die Lokalisierung genetisch kartierter ρ^- Mutanten

(Tabelle 9) durch die Restriktionsanalyse erlaubt es, die codierenden Sequenzen (Exon $\alpha - \epsilon$) der Restriktionskarte zuzuordnen (Abb.34). Fünf von Slonimski et al., 1978a, charakterisierte ρ^- Mutanten wurden hinzugenommen.

14.1. Exon ϵ

ρ^- MM1A9 und MM1A11 enthalten Teile von Exon ϵ . Die im HpaII Fragment 6 lokalisierte HaeIII Spaltstelle ist in der ρ^- hb2 vorhanden, die benachbarte BamHI Spaltsequenz nicht. Deshalb wird als äußerste Begrenzung des Exons ϵ die BamHI Stelle angegeben, wahrscheinlich endet es jedoch bereits an der HaeIII Schnittstelle. Damit erstreckt sich Exon ϵ vom HpaII Fragment 5a aus maximal 500 Bp in das HpaII Fragment 6 hinein.

14.2. Exon δ

ρ^- BD4 enthält Exon β, γ, δ , aber nicht ϵ ; ρ^- MM1A9 dagegen einen Teil von ϵ , ganz δ , aber keine zu γ gehörenden Marker. Durch die Überlappung der DNS Sequenzen beider ρ^- Stämme kann Exon δ innerhalb des HindII-HindIII Fragmentes lokalisiert und seine maximale Länge mit 125 Bp angegeben werden.

14.3. Exon γ

ρ^- hb2 codiert Exon ϵ, δ und γ , ρ^- B12 Exon ϵ, δ , aber nicht γ . Exon γ liegt daher innerhalb des DNS Segmentes, das in ρ^- hb2, aber nicht in ρ^- B12 enthalten ist. Für eine genauere Eingrenzung des Exons γ spricht, daß i) die Genomsequenzen von ρ^- A6 und hb2 überlappen können, ρ^- A6 Exon γ aber nicht enthält, ii) die DNS von ρ^- B2

maximal bis zur HaeIII Schnittstelle reicht, Exon γ jedoch nur zum Teil von dieser ρ^- codiert wird. Damit beginnt γ kurz vor der EcoRI Spaltstelle und erstreckt sich maximal 425 Bp in das HaeIII Fragment 8 hinein.

14.4. Exon β

ρ^- A11 enthält alle Marker von Exon β und - bis auf den randständigen - auch alle von Exon α ; ρ^- A19 codiert nur für Exon β , ρ^- BD4 für δ , γ und β . Exon β wird damit durch den Bereich der Überlappung der drei ρ^- Genome im HpaII-BamHI Fragment lokalisiert und ist maximal 400 Bp lang.

14.5. Exon α

Die DNS von ρ^- A9 codiert für alle Exon α -Marker und reicht über die COB Region hinaus in Richtung Oli 2; ρ^- A11 codiert alle Marker des Exons β und α , bis auf den randständigen. Exon α umfaßt damit den Bereich der Überlappung der DNS Sequenzen von ρ^- A9 und A11; es beginnt im BamHI-HindIII Fragment und sollte nicht über die HpaII Schnittstelle hinausreichen, da die DNS von ρ^- A11 die HpaII Spaltstelle nicht enthält.

Damit kann die äußere Begrenzung von Exon α nicht genau festgelegt werden und seine maximale Ausdehnung nur annähernd mit 800 Bp angegeben werden.

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden:

1. Die codierenden Sequenzen (Exon $\alpha - \epsilon$) sind durch verschieden lange DNS-Segmente voneinander getrennt.
2. Mit Hilfe der Restriktionskartierung lassen sich Lage

und maximale Längen für Exon β , γ und δ genau bestimmen; für die begrenzenden Exons α und ϵ können Lage und maximale Ausdehnung nur annähernd angegeben werden.

3. Durch die Festlegung der maximalen Längen der Exons können die minimalen Längen der dazwischenliegenden Sequenzen, der Introns, mit $I_{\alpha\beta} = 1920$ Bp, $I_{\beta\gamma} = 1370$ Bp, $I_{\gamma\delta} = 1320$ Bp und $I_{\delta\epsilon} = 800$ Bp errechnet werden.

Teil 3: Identifizierung der COB Transkripte

15. Modell der Transkription (Translation) eines Mosaic-genes

Haid et al., 1979, stellten auf Grund von Protein- und genetischen Daten fest, daß die COB Region Mosaicgen-Struktur besitzt. Teil 2 dieser Arbeit bestätigt die Ergebnisse, da an Hand von Restriktionsanalysen nachgewiesen werden konnte, daß fünf Sequenzen, codierend für Apocytochrom b, auf der DNS voneinander getrennt angeordnet sind und unterbrochen werden von "intervening sequences", den Introns. Die Bedeutung der Introns ist bisher nicht bekannt; sie tragen jedoch keinen Informationsgehalt für das Genprodukt der COB Region. Die Intronbereiche dürfen also entweder nicht transkribiert oder müssen i) nach der Transkription oder ii) auf Proteinebene wieder abgebaut werden.

Bei der Analyse mitochondrialer Proteine konnte zwar in seltenen Fällen ein höhermolekulares (<30 Kilodalton), mit Apocytochrom b verwandtes Genprodukt identifiziert werden. Da dieses jedoch in der Größenordnung vom VarI Protein liegt (Bechmann, pers. Mitteilung; Butow et al., 1977), kommt es auf Grund seiner Größe (42 - 45 Kilodalton) wahrscheinlich nicht als "Vorläuferprotein" für Apocytochrom b (ca 200 Kilodalton) in Frage. Eine ausschließliche Regulation auf Translationsebene scheint daher nicht gegeben zu sein. Es ist daraufhin anzunehmen, daß die endgültige mRNS auf dem Niveau der Transkription gebildet wird. Dazu sind folgende vier Hypothesen denkbar:

1. Jedes Exon trägt eine Initiationsstelle für die Polymerase und wird einzeln transkribiert; die einzelnen RNS Sequenzen werden danach zum Messenger ligiert (RNS-Teilstücke $\longrightarrow$ mRNS).
2. Die Intronbereiche werden vor der Transkription aus der DNS herausgeschnitten; die Exons werden durchgehend abgelesen und transkribiert ($\longrightarrow$ mRNS).
3. Es gibt nur eine Initiationsstelle innerhalb der COB Region für die Polymerase; die Exons werden durchgehend abgelesen und transkribiert; die Polymerase überspringt dabei die Intronsequenzen ($\longrightarrow$ mRNS).
4. Die COB Region wird als Ganzes transkribiert; aus der entstehenden "Precursor"RNS werden gleichzeitig oder nacheinander die Intronsequenzen herausgeschnitten, bis der endgültige Messenger - nur bestehend aus Exonsequenzen - vorliegt ("Precursor" $\longrightarrow$ "splicing" $\longrightarrow$ mRNS).

Um das (die) Transkript(e) der COB Region zu identifizieren, war es notwendig, mitochondriale RNS Spezies voneinander zu trennen. Dafür schienen gelelektrophoretische Methoden geeignet zu sein.

16. RNS Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Beweglichkeit einer Nukleinsäure im Gel ist auch von ihrer Konformation abhängig. Um Konformationseffekte auszuschließen und eine rein molekulargewichtsabhängige Auftrennung zu erhalten müssen denaturierende Agenzien zugesetzt werden, z.B. Formamid, Formaldehyd, Harnstoff oder MHg-hydroxid (Lehrach et al., 1977; Bailey

et al., 1976). Für die Identifizierung verschiedener mtrNS Spezies aus Hefe erwiesen sich Harnstoff-Agarose und MHg-hydroxid-Agarosegele als besonders geeignet (Morimoto et al., 1979; van Ommen et al., 1977, 1979; Abb. 36). Da die RNS im Harnstoff-Agarosegel sehr gut anfärbbar ist, sind diese den Quecksilbergelen vorzuziehen, um Transkripte in ganz geringen Konzentrationen zu entdecken; da jedoch nur MHg-hydroxid-Agarosegele vollständige Denaturierung ermöglichen, sind diese dann erforderlich, wenn eine genaue Kalibrierung des Molekulargewichtes der jeweiligen RNS Spezies erwünscht ist.

16.1. Molekulargewichtsbestimmung der RNS Spezies im MHg-hydroxid-Agarosegel

Die mitochondrialen RNS Spezies und die trNS sind durch den Vergleich mit Gelelektrophoresen anderer Autoren zu identifizieren (Morimoto et al., 1979; Locker et al., im Druck) und werden hier als Molekulargewichtsstandard verwendet. In diesem Bereich (5 S bis 21 S) verläuft die Eichkurve linear. Die cytoplasmatischen rRNS können nicht als Standard herangezogen werden, da sie vollkommen unterschiedliche Laufverhalten zeigen (Abb. 36a und c). Diese Divergenz resultiert vor allem aus dem viel höheren GC Gehalt der cytoplasmatischen RNS im Vergleich zur mitochondrialen. Daher ist es auch schwierig, andere Molekulargewichtsmarker zu finden. Die im folgenden bestimmten S Werte können also nur im Bereich von 5-21 S als gesichert angesehen werden, alle höhermolekularen S Werte müssen als Näherungen verstanden werden.

17. Bindung von RNS aus MHg-hydroxid-Agarosegelen an DBM Papier

Die gelelektrophoretische Auftrennung der verschiedenen mtRNS Spezies in den oben gezeigten Gelsystemen ist zwar ausreichend, um durch den Vergleich von Wt- und Mutanten-RNS Aufschluß über das Vorhandensein und die Größe eines oder mehrerer Transkripte zu geben. Eine sensiblere und eindeutige Methode für die Identifizierung ganz bestimmter, in geringen Mengen vorhandener, RNS Spezies ist jedoch die Hybridisierung mitochondrialer RNS mit DNS, welche die gesamte oder Teilbereiche der COB Region enthält. Dazu müßte es möglich sein, die RNS aus den Gelbanden auf Filter zu übertragen. Da RNS nicht an Nitrozellulosepapier bindet, kann die von Southern, 1975, entwickelte Technik hier nicht verwendet werden. Alwine et al. haben 1977 eine Methodik herausgebracht und später verbessert (Alwine et al., 1979), die es ermöglicht, einzelsträngige Nukleotide - in diesem Fall RNS - kovalent an Diazobenzyl-oxymethylgruppen eines beschichteten Papiers (DBM-Papier) zu binden.

18. Hybridisierung von filtergebundener Wildtyp RNS mit verschiedenen DNS Sequenzen aus der COB Region

18.1. Hybridisierung von filtergebundener Wildtyp RNS mit Exon/Intron Sequenzen der COB Region

Mitochondriale Wildtyp RNS wurde - siehe Methoden - an DBM-Papier gebunden und mit einem Gemisch "nick translatierter" DNS aus rho⁻ MM1A9 und B9 hybridisiert. Das Gel wurde vor dem Transfer angefärbt und photographiert (Abb. 37a).

Abb.37b zeigt die Autoradiographie nach der Hybridisierung. Bei der höchsten RNS Konzentration (Geltasche 4; 20 µg RNS) sind die entstehenden Banden am deutlichsten zu erkennen. Der Nachweis, daß diese Banden auch mtRNS enthalten, konnte geführt werden durch den Vergleich i) mit der Hybridisierung desselben DNS Gemisches gegen cytoplasmatische RNS (Abb.37d) und ii) mit der Hybridisierung gegen vorher vollständig degradierte RNS (Abb.37c).

Die mitochondriale DNS, die den Bereich von Intron $\beta\gamma$ bis Exon ϵ innerhalb der COB Region abdeckt, hybridisiert mit RNS Spezies von 15 S, 18 S, 20 S, 24 S, 26 S und 28 S, wobei die Hybridisierung gegen 18 und 24 S am stärksten ist.

Dasselbe Bandenmuster trat auf, wenn als radioaktive DNS-Probe $\rho\text{-}^{32}\text{P}$ -dd22 DNS eingesetzt wurde. Mit diesem Ergebnis können die in 15. aufgestellten drei Hypothesen geprüft werden:

1. "Jedes Exon wird einzeln transkribiert"

Da die COB Region aus fünf codierenden Sequenzen besteht, sollten fünf Einzeltranskripte in der Größenordnung von 2 - 4 S auftreten und nur eine höhermolekulare RNS. Diese würde dann dem endgültigen Messenger entsprechen.

Solch eine Bandenverteilung konnte nicht beobachtet werden.

2. "Die Introns werden aus der DNS herausgeschnitten; nur die Exons werden transkribiert" und

3. "Die Exons werden durchgehend abgelesen; Die Polymerase überspringt dabei die Intronsequenzen"

Solche Mechanismen - siehe 2. und 3. - fordern, daß nur ein

einziges Transkript gebildet wird; dieses Transkript wäre dann der COB Messenger. In dem oben dargestellten Versuch wurde Hybridisierung mit mehreren, auch hochmolekularen, RNS Spezies gefunden. Alle drei Hypothesen - 1., 2. und 3. - können hier nicht bestätigt werden.

4. "Die COB Region wird als Ganzes abgelesen; aus dem "Precursor" Molekül werden die Intronsequenzen herausgeschnitten und damit der endgültige Messenger erhalten!"

Sollte diese Möglichkeit zutreffen, so wäre eine Hybridisierung mit einer oder mehreren hochmolekularen RNS Spezies zu erwarten, die dem oder den "Precursor(s)" entsprächen, und Hybridisierung mit einer RNS im Bereich von 11-18 S (14 S = 1800 Nukleotide; Morimoto et al., 1979), die dann dem Messenger gleichkäme. Die verwendete DNS - Intron + Exonmaterial der COB Region enthaltend - hybridisiert mit sechs RNS Spezies im Bereich von 15-28 S. Dieser Befund steht im Einklang mit der 4. Hypothese.

18.2. Hybridisierung von filtergebundener Wildtyp RNS mit einem DNS Fragment aus Intron α/β

In 18.1. konnte gezeigt werden, daß bei der Transkription einer "split gene" Region der mitochondrialen DNS hochmolekulare RNS Spezies (20, 24, 26 und 28 S) auftreten und RNS Spezies von 15 und 18 S, die dem Messenger entsprechen könnten. Als nächstes war zu klären, welches der beiden in Frage kommenden Transkripte den COB Messenger darstellt. Dazu wurde als radioaktive DNS Probe ein Restriktionsfragment (AluI F. = 210 Bp) der ρ^- B1 ge-

wählt, die nur Intron $\alpha\beta$ Material zurückbehalten hat. Ein Fragment, das keine codierenden Sequenzen mehr enthält, sollte nicht mit dem processierten Messenger hybridisieren. Das Ergebnis ist in Abb.38b zu sehen: Von den hochmolekularen RNS Spezies sind die 24 S (stark), 26 S und 28 S RNS zu identifizieren; 15 S ist schwach zu erkennen, zusätzlich tritt eine Bande bei 17 S, dafür keine bei 18 S auf. Das Fehlen der 18 S RNS spricht dafür, daß es sich bei dieser RNS Spezies um den Messenger der COB Region handelt. Zusätzlich deutet das Fehlen der 20 S RNS in der Hybridisierung mit DNS Sequenzen aus Intron $\alpha\beta$ darauf hin, daß die 20 S RNS eine Vorstufe des Messenger ist, die das Intron $\alpha\beta$ nicht mehr enthält.

18.3. Hybridisierung filtergebundener Wildtyp RNS mit DNS Sequenzen aus Intron $\alpha\beta$ + Exon β

Die Ergebnisse aus 18.1. und 18.2. konnten bestätigt werden durch Hybridisierung von Wildtyp RNS mit der DNS aus ρ^- A19. A19 enthält das kleine Exon β und den an β angrenzenden Teil des Introns $\alpha\beta$. Abb.38c zeigt das Ergebnis: Hierbei sind wieder die hochmolekularen RNS Spezies zu erkennen (24, 26 und 28 S), ebenso die 15 und die 20 S, sowie eine Doppelbande bei 17 und 18 S. Die 18 S Bande ist in diesem Fall nur schwach zu sehen (vgl. Abb.37b und 38a). Da reines Intronmaterial nicht mit einer 18 S RNS hybridisiert (vgl. Abb. 38b) kann das schwache Auftreten dieser Bande damit erklärt werden, daß bei der Hybridisierung mit DNS aus ρ^- A19 sehr wenig Exonmaterial (max = 400 Bp, min = 50 Bp;

Bechmann, pers. Mitteilung) im Gegensatz zu Intronsequenzen eingesetzt wurde. Das Umgekehrte gilt für die 17 S RNS: Diese Bande ist nur dann zu erkennen (vgl. Abb.38a,b), wenn für die Hybridisierung vor allem Intronmaterial eingesetzt wird.

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden:

1. Eine bei 18 S auftretende RNS Bande scheint dem COB Messenger zu entsprechen, da i) Intron/Exonmaterial enthaltende DNS der COB Region mit 18 S stark, ii) Intron/(Exon)material ganz schwach und iii) nur Intronsequenzen enthaltende DNS gar nicht mit 18 S hybridisiert.
2. Bei der 15 S RNS kann es sich nicht um den COB Messenger handeln, da reines Intronmaterial auch Hybridisierung mit der 15 S RNS zeigt. Ebenso kann die 17 S RNS nicht der COB Messenger sein, da diese Bande nur auftritt, wenn eine Hybridisierung mit Intronmaterial durchgeführt wird.
3. DNS aus der COB Region hybridisiert mit hochmolekularen RNS Spezies, die auf Grund ihrer Größe "Precursor" RNS Moleküle sein sollten.
4. DNS aus Intron α/β hybridisiert nicht mit hochmolekularer 20 S RNS. Die 20 S RNS scheint also diejenige "Precursor" RNS zu sein, aus der das Intron α/β schon eliminiert worden ist ("splicing").

D i s k u s s i o n

1. Lokalisierung genetischer Marker auf einer Hybridisierungskarte des gesamten mitochondrialen Genoms

Genetische Analysen basierend auf der Bestimmung von Rekombinationshäufigkeiten und/oder der Co-Retention von Markern in ρ^- Mutanten führen zu einer Festlegung der Reihenfolge mitochondrialer Marker und ihrer relativen Abstände voneinander (Lang et al., 1976; Kotylak und Slonimski, 1976; Tzagoloff et al., 1976a). Obwohl keine Hinweise auf "hot spots" der Rekombination oder der ρ^- Deletion gefunden werden konnten, was eine Kartierung erschweren oder verfälschen würde, geben genetische Karten nur relative Angaben und keine physischen Einheiten wieder.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Hybridisierungskarte verwendet ebenfalls genetisch analysierte ρ^- Mutanten, aber zusätzlich biochemische Elemente anhand der Hybridisierungswerte elektrophoretisch aufgetrennter mtDNS mit c-RNS. Die erhaltenen Daten geben reale Längen der enthaltenen Wt-Genomsequenz in einer bestimmten ρ^- Mutante wieder, da als Bezugsgröße das ρ^+ (KL14-4A) Genom mit einer konstanten Länge von 75000 Bp gewählt wurde. Damit können auch den verwendeten Markern physische Abstände auf der mtDNS zugeordnet werden.

Die hier dargestellte Methode führt i) zu einer Lokalisierung der Loci für Apocytochrom b (COB), die Untereinheit I der Cytochrom Oxidase (Oxi 3), für Temperatursensi-

bilität ts983 (Bolotin-Fukuhara et al., 1977) und tsm 8 (Schweyen et al., 1976), für die Resistenz gegen Chloramphenicol (Cap) und Oligomycin (Oli 2) und ii) zur Eingrenzung der Loci für die Untereinheit III der Cytochrom Oxidase (Oxi 2) und für die Resistenzen gegen Paromomycin (Par) und Oligomycin 1 (Oli 1).

Zu einer vergleichbaren Lokalisierung der beschriebenen Marker gelangen andere Arbeitsgruppen mit Restriktionsanalysen mitochondrialer DNS aus ρ^+ und ρ^- Stämmen (Sanders et al., 1976; Heyting et al., 1976; Morimoto et al., 1976; Lewin et al., 1977) und Hybridisierungsanalysen von ρ^+ und ρ^- mtDNS (Sriprakash et al., 1976; Nagley et al., 1976). Die letztgenannte Kartierungsmethodik basiert auf ähnlichen Überlegungen wie sie der hier dargestellten zu Grunde liegen. Da jedoch Sriprakash et al., 1976, nur wenige ρ^- Mutanten untersucht haben, ist die Eingrenzung einiger Antibiotika-Resistenzloci - verglichen mit den Bestimmungen anderer Arbeitsgruppen (siehe oben) - nicht sehr genau. Die in dieser Arbeit beschriebene Methode, welche eine schnelle Reindarstellung mitochondrialer DNS mit Hilfe eines Elektrophorese-Verfahrens ermöglicht, hat dagegen den Vorteil, viele ρ^- Stämme gleichzeitig analysieren zu können. Deshalb sollten sich mit dieser Methode Ungenauigkeiten auf Grund von Untersuchungen einer zu kleinen Anzahl verschiedener Mutanten zukünftig vermeiden lassen.

Eine wie hier dargestellte Kartierung wird wesentlich erleichtert, wenn ein Fest- bzw. Anfangspunkt gegeben ist. In diesem Fall wurde von der für Apocytochrom b codierenden Region ausgegangen. Innerhalb der COB Region waren mit Hilfe von Rekombinations- und Co-Retentionsanalysen (Schweyen et al., 1977; Pajot et al., 1977) verschiedene, nicht allele Mutationsorte kartiert und auf Grund von Kopplungshäufigkeiten in mindestens zwei verschiedene Kluster eingeteilt worden. Die beiden außenstehenden Marker gehören jeweils einem dieser Kluster an: COB 1431 zu COB 1 (Tzagoloff et al., 1976b) und COB 1282 zu COB 2. Nach der genetischen Kartierung liegen sie zwischen 3 und 5 Karteneinheiten (nach Schweyen et al., 1977: 100 Karteneinheiten $\hat{=}$ mtGesamtgenom $\hat{=}$ Summe der durchschnittlichen Trennungskoeffizienten einzelner Marker) voneinander entfernt. Da bei der Hybridisierungskartierung die COB Region definitionsgemäß als Punkt angenommen wurde, kann die resultierende Karte nur auf $\pm$ 5% genau sein. Für eine Grobkartierung des gesamten mtGenoms, wie sie in diesem Teil der Arbeit beabsichtigt war, liegen diese Ungenauigkeiten im zulässigen Fehlerbereich. Eine Feinkartierung - wie sie anschließend für die COB Region erstellt wurde - ist jedoch genauer anhand von Restriktionsanalysen durchzuführen (siehe Einleitung zu Ergebnisse Teil 2).

2. Lokalisierung der für Apocytochrom b codierenden Bereiche

a. Lokalisierung der gesamten COB Region

Rho⁻ Mutanten sind nicht nur für eine Hybridisierungs-kartierung des gesamten mitochondrialen Genoms geeignet (siehe oben), sondern auch für die Größenbestimmung kleinerer Regionen - wie der für Apocytochrom b codierenden - und die Kartierung genetischer Marker innerhalb eines solchen Genomabschnittes.

Zu Beginn dieser Arbeit war über die COB Region bekannt, daß sie zwischen den Genorten Oli 1 und Oli 2 lokalisiert ist. Die Restriktionsanalysen und Hybridisierungsdaten einer rho⁻ Mutante, die diesen Genomabschnitt vollständig enthält, dagegen nicht für Oli 1 und Oli 2 codiert, läßt die Lokalisierung der COB Region innerhalb der Wt-Fragmente TT8, DT13 und TD7 (Nomenklatur von Sanders et al., 1977) zu und die Bestimmung ihrer maximalen Größe von 10.000 Bp. An Hand von Restriktionsdaten der DNS weiterer rho⁻ Klone konnte die Länge der DNS Sequenz innerhalb der randständigen Mutationsorte bestimmt werden. Damit ist die COB Region mindestens 7000 Bp lang und den Restriktionsfragmenten TT5 und RR6 zugeordnet.

Diese Zuordnung zur Restriktionskarte des KIM4-4A Wt-Genoms entspricht den Daten anderer Arbeitsgruppen, wobei die Größenangaben der COB Region in früheren Arbeiten zwischen 3000 Bp (Maximalgröße: Grivell et al., 1978; Minimalgröße: Mahler, 1978) und 10.000 Bp (Alexander et al., 1978) variierten. In vollständiger Übereinstimmung stehen die

hier vorgestellten Ergebnisse mit denen von Slonimski et al., 1978a, die COB ebenso innerhalb der Restriktionsfragmente TT5 und RR6 lokalisieren.

b. Lokalisierung der codierenden Bereiche innerhalb der COB Region

Nachdem lange Zeit unklar war, ob mehr als eine Form des Apocytochrom b in den Mitochondrien vorkommt, konnten die Ergebnisse von Haid et al., 1979, die verschiedenen, scheinbar widersprüchlichen Daten erklären: Die COB Region ist in fünf, nicht zusammenhängende Bereiche gegliedert ($\alpha - \epsilon$), die für das Apocytochrom b Genprodukt codieren. Mutanten, deren Mutationsorte innerhalb dieser Abschnitte kartieren, zeigen Translationsprodukte mit colinear zu ihrem Mutationsort ansteigenden Fragmentgrößen (Oli 2 $\rightarrow$ α bis $\epsilon \rightarrow$ Oli 1). Die Ergebnisse beweisen die Codierung eines einzigen Apocytochrom b Genproduktes durch die COB Region. Für die dazwischenliegenden Bereiche sind zum Teil auch Mutationsorte kartiert (Kreike et al., 1979; Slonimski et al., 1978a,b). Über die Funktion dieser Introns (α/β bis δ/ϵ) bestehen jedoch bisher nur Vermutungen (siehe Ergebnisse 11.).

Untersuchungen über die Mosaikgen-Struktur einer Region - wie COB - müssen notwendigerweise Analysen der DNS einschließen, um den im Rekombinationstest gefundenen relativen Abständen der Exons voneinander physische Abstände zuzuordnen. Daher wird in der vorliegenden Arbeit anhand von Restriktionsanalysen der DNS verschiedener rho⁻ Klone,

die nur Teilbereiche der COB Region enthalten, nachgewiesen, daß die codierenden Bereiche durch verschieden lange DNS Sequenzen voneinander getrennt sind.

Für die Bestimmung der Lage der Exons wurden zusätzlich zu den hier erstellten Daten noch fünf von Slonimski et al., 1978a, untersuchte Mutanten hinzugezogen. Das war möglich, nachdem festgestellt worden war, daß sich die von dieser Gruppe erarbeitete HaeIII Karte auf das hier verwendete System übertragen läßt. Dabei ergibt sich für die maximalen Längen der Exons:

$$\alpha = 800 \text{ Bp}; \beta = 400 \text{ Bp}; \gamma = 425 \text{ Bp}; \delta = 125 \text{ Bp}; \varepsilon = 500 \text{ Bp}.$$

Im Vergleich dazu lassen sich aus den von Bechmann, pers. Mitteilung, bestimmten Fragmentlängen der Mutantenproteine Annäherungswerte für die Minimallängen der Exons berechnen (siehe Abb.26): $\alpha = 335 \text{ Bp}$; $\beta = 25 \text{ Bp}$; $\gamma = 108 \text{ Bp}$; $\delta = 60 \text{ Bp}$; $\varepsilon = 195 \text{ Bp}$. Dabei wird deutlich, daß die auf Grund von Restriktionskartierung angegebenen Maximalwerte, außer dem für Exon δ , viel höher liegen, als die indirekt berechneten. Sie zeigen jedoch, ebenso wie die genetischen und die Proteindaten, daß es sich bei α , γ und ε um die "großen" codierenden Bereiche handelt, denen die früher benutzten Bezeichnungen A, C und E entsprechen (Haid, 1979). Die geringe Größe von β und δ erklärt auch, warum diese beiden Exons zu Beginn der Untersuchungen nicht aufgefunden werden konnten (Slonimski et al., 1978b; Haid, 1979). Im Vergleich zu den Daten von Slonimski et al., 1978a,b, ist Exon β lokalisiert und γ , δ und ε besser eingegrenzt.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hybriden zwischen *Sacch.carlsbergensis* mRNS und der DNS aus KL 14-4A (Grivell et al., 1979) und Transkriptanalysen (van Ommen et al., 1979) führen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß die COB Region aus fünf, nicht unmittelbar aneinandergrenzenden Sequenzen besteht. Die von den Autoren bestimmten Größen der dazwischenliegenden Introns oder "intervening sequences" stimmen für alle Introns mit den hier gefundenen Minimalwerten überein: $\alpha\beta = 1920$ Bp; $\beta\gamma = 1370$ Bp; $\gamma\delta = 1320$ Bp; $\delta\epsilon = 800$ Bp. Da Intron $\alpha\beta$ bei der Transkriptanalyse von besonderem Interesse ist (siehe vorne; van Ommen et al., 1979), scheint es in Zukunft notwendig, eine verfeinernde Restriktionsanalyse dieser Region, z.B. mit Enzym AluI, vorzunehmen.

3. Die Transkriptionsprodukte der COB Region

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß die COB Region genau wie der für die 21 S RNS codierende Bereich (Bos et al., 1978; Heyting et al., 1979b; Faye et al., 1979) und der Oxi 3 Locus (Grivell et al., 1979) Mosaicgen-Struktur besitzt, stellte sich die Frage, wie solch eine "split gene" Region transkribiert und der Messenger gebildet wird. Durch die Restriktionskartierung der DNS verschiedener ρ^- Stämme ist es möglich, DNS Proben zu erhalten, die entweder für Intron- und Exon- oder nur für Intronbereiche von COB codieren. Hybridisierungsanalysen gelelektrophoretisch aufgetrennter mRNS mit DNS aus Intron/Exonregionen zeigen das Auftreten von RNS Spezies, die

wegen ihres hohen Molekulargewichtes als "precursors" zu verstehen sind. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß auch bei Hefemitochondrien ähnliche Regulationsmechanismen vorzuliegen scheinen, wie sie für eukaryontische Systeme bekannt sind (siehe zur Übersicht Darnell, 1978), d.h. die für ein Polypeptid codierende DNS Sequenz wird als Ganzes transkribiert; aus der daraus resultierenden "precursor" RNS werden die nicht codierenden Bereiche ("intervening sequences") mit Hilfe spezieller Enzyme herausgeschnitten ("processing").

Bei den hier durchgeführten Hybridisierungsanalysen entspricht die am deutlichsten hervortretende Bande einer 18 S RNS. Reines Intronmaterial enthaltende DNS Proben hybridisieren dagegen gar nicht mit dieser 18 S RNS. Das spricht dafür, daß die 18 S RNS dem "processierten" Messenger gleichkommt, denn die mRNA sollte keine an "intervening sequences" transkribierten Bereiche enthalten und deshalb mit solchen DNS Proben auch keine Hybridisierung aufweisen.

Schon 1977 war von van Ommen et al. nachgewiesen worden, daß die 18 S RNS mit zwei Bereichen (damals COB 1 und COB 2) innerhalb des COB/BOX Locus hybridisiert; obwohl diese Befunde noch nicht in den Zusammenhang mit einem "split gene" System gebracht wurden, waren es erste Hinweise auf eine 18 S RNS als Messenger der COB Region. Neueste Daten von van Ommen et al., 1979, bestätigen die Annahme, daß das hauptsächlich auftretende Transkript

der COB Region eine 18 S RNS darstellt, die mit fünf, nicht zusammenhängenden DNS Sequenzen hybridisiert. Dieselbe Aussage können Grivell et al., 1979, mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen treffen.

Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie und der Hybridisierung isolierter RNS Spezies mit DNS verschiedener Restriktionsfragmente (van Ommen et al., 1979) liegt mit dem hier angewandten "RNS blotting" eine Methode zur direkten Erkennung aller auftretenden RNS Spezies vor. Diese Technik hat mindestens vier hochmolekulare Transkripte aufgezeigt, die jeweils eine oder mehrere der "intervening sequences" enthalten. Da die DNS Probe aus Intron $\alpha\beta$ mit dreien dieser RNS Spezies hybridisiert (24, 26 und 28 S), jedoch nicht mit der 20 S RNS, ist anzunehmen, daß der 20 S RNS "precursor" das Intron $\alpha\beta$ nicht mehr, die 24, 26 und 28 S "precursors" aber das Intron $\alpha\beta$ noch enthalten.

Van Ommen et al., 1979, finden für die 20 S RNS ein Hybridisierungsmuster, das dem der 18 S RNS sehr ähnlich ist; beide RNS Spezies hybridisieren mit DNS aus Sacch. cer. und aus Sacch. carlsbergensis, die weder Intron $\alpha\beta$ noch $\beta\gamma$ hat. Darüber hinaus zeigt die 20 S RNS eine starke Bande mit einem Restriktionsfragment aus Intron $\delta\epsilon$.

Die Autoren schließen daraus, daß die 20 S RNS Intron $\delta\epsilon$ enthalten muß. Sie finden weiterhin einen 23 S "precursor" (entspricht im hier dargestellten System der 24 S), von dem sie vermuten, daß dieser "precursor" In-

tron $\gamma\delta$ und $d\epsilon$ trägt, und eine 26 S RNS, die eventuell $\alpha\beta$ oder $\beta\gamma$ enthalten kann.

Die hier dargestellte direkte Methode scheint jedoch am besten geeignet, den Modus des "splicing" (Herausschneidens) von Intronsequenzen zu untersuchen, da nicht nur Wt-RNS, sondern auch die RNS von mit⁻ Mutanten an DBM-Papier gebunden und mit DNS aus jedem Bereich der COB Region hybridisiert werden kann. Die Daten solcher Versuchsreihen - nach Abschluß des experimentellen Teils dieser Arbeit durchgeführt - deuten auf einen komplexen, an keine Leserichtung gebundenen Mechanismus der(des) "splicing" Enzyme(s) hin. Eukaryontische Systeme scheinen damit einen sehr vielschichtigen Mechanismus der Regulation der Genexpression aufzuweisen.

Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* mit ihrem genetisch gut charakterisierten Genom haben sich für die dadurch auftretenden Fragestellungen bisher als ideales Versuchsobjekt erwiesen und lassen hoffen, in naher Zukunft die Frage nach der Regulation der Transkription und Translation, sowie der Bedeutung der Geninsertionen lösen zu helfen.

Tabelle 1:

Stamm	Kerngenotyp	mitochondrialer Genotyp	Herkunft
KL14-4A	a, <u>his</u> 1, trp2	rho ⁺ Cap ^r -321, Oli ^r 1-1 Par ^r -454	Wolf et al., 1973
MM1A9, MM1A11	a, <u>his</u> 1, trp2	rho ⁻ , abgeleitet von KL14-4A	Mathews, Dissertation in Vorbereitung
A9, A6, A11, A15 A19, hb2 B1, B2, B9, B12, B17	a, <u>his</u> 1, trp2	rho ⁻ , abgeleitet von KL14-4A	Slonimski et al., 1978a
RM590-9D	a, trp1, tsp25	rho ⁺ , Cap ^r -321, Ery ^r - 221, Oli ^r 1-1, Ana ^r -101, Par ^r -454	Schweyen et al., 1977
BD4	a, trp1, tsp25	rho ⁻ , abgeleitet von RM-590-9D	Schweyen et al., 1978
RM511-4A	a, ura3, trp1, tsp25	Ery ^r -221, Oli ^r 2-1, Par ^r -454	Schweyen et al., 1977
dD22	a, ura3, trp1, tsp25	rho ⁻ , abgeleitet von RM511-4A	Schweyen et al., 1978
777-3A	a, ade2, op1	rho ⁺	Kováčová et al., 1968

Geprüfte rho ⁻ Klone *	Begrenzende genetische Marker	Länge der Genomsequenz in	
		% Hybridisierung rho cRNA / rho DNA	Genetischen a) Karteneinheiten
G 41	cob-1282 oxi3-2501	25	25
AA 2	cob-1282 oxi3-2501	25	25
G 81	cap cob-1282	18	20-35
G 71	cap cob-1282	24	20-35
H 21	cob-2011 par	46	45-60
H 31	tsm8 cap	8	8-25
G 31	oli1 cob-3881	11	5-40
F 6/2	par oxi2-2532	17	15-40
F 6/3	oli2 par	26	29-57
B 61	cob-1282 oxi3	33	28-45
AF 5	cob-1282 cob-1625	11	3-14
BB 5	cob-1282 oli2	13	14-23
BB 4	cob-1431 ts983**	13	-
AD ?	cob-1282 par	42	41-55
CA 5	cob-1431 oxi1	35	38-42
CA 3	cob-1431 oxi1	35	38-42
0342242	par tsm8	50	28-53
rho ⁺	cap cap	100	100

Tabelle 2: Bestimmung der Länge der in verschiedenen rho⁻-Klonen enthaltenen Sequenzen

a) Durch genetische Analyse bestimmte Minimal- und Maximal-Längen (Schweyen et al., 1977)

* Herkunft der rho⁻-Klone von Stamm RM590-9D bzw. RM511-4A (Bezeichnung Schweyen, pers. Mitteilung)

** ts 983 (Bolotin-Fukuhara et al., 1977)

Geprüfte rho Klone	Begrenzende genetische Marker	Überlappung des Genomsegments in % Hybridisierung G 34Σ242 cRNS/rho DNS
B 91	cob 1431 oxi1	9,5
B 611	cob 1282 oxi3	15
gE 2	cob 1282 oxi3	15
B 61	cob 1282 par	36
G34Σ232	par oxi2	78
A 63	oli2 oxi3	6
G34Σ242	par tsm8	100

Tabelle 3: Überlappung des Genomsegments von rho⁻ Klonen mit der DNS
der rho⁻ G 34Σ242

Genetische Marker	Abstände genetischer Marker von Cap/Ery in Karteneinheiten	
	Minimal	Maximal
Cap / Ery	0 / 100	2
ts 983 ^{a)}	5	7
Oli 1	7	16
Cob-1282 / 1431	18	18
Oli 2	29	31
Oxi 3	43	44
Par	51	57
Oxi 2	64	74
Oxi 1	87	91
tsm 8	92	94

Tabelle 4: Entfernung der genetischen Marker von Cap / Ery

a) genetisch kartiert von Bolotin-Fukuhara et al., 1977

Fragment Nr.	A (Bp)	B (Bp)
1	25 000	24 000
2	22 000	19 500
3	11 000	10 500
4	8 800	8 600
5	7 900	7 700
6	3 350	3 225
7	2 300	2 200
8	1 500	1 350
9	950	950

Tabelle 5: Vergleich der Fragmentlängenbestimmung nach
Spaltung von KL 14 -4A mit DNS mit Eco RI
A: P 22 / Eco RI als Marker DNS
B: Nach Sanders et al., 1977

Restriktions- Enzym(e)	dD 22		BD 4		MM1A9	A 11
	Restriktions- Fragment(Bp)	Hybridisierung mit rho ⁺ -Frag.	Restriktions- Fragment(Bp)	Hybridisierung mit rho ⁺ -Frag.	Restriktions- Fragment(Bp)	Restriktions- Fragment(Bp)
	a	b	c	d	e	f
Eco R I	7 600 3 200 RR 6	RR 3 RR 6	3 200	RR 3 RR 6	-	-
Bam H I	nu	BB 2 BB 4 BB 5	6 400	nu	nu	3 050
Eco R I + Bam H I	6 000 3 150 RB 8 1 400 BR 11	RB 4 RB 7 RB 8 BR 11	3 100 1 400 BR 11	RB 8 BR 11	-	-
Eco R I + Hin d III	7 600 2 150 DR 9 1 075 RD 12	RR 3 DR 9 (RD 2) RD 12	nu	RR 3 DR 9 RD 12	-	-
Eco R I + Hin d II + III	4 400 TR 8 3 150 1 200 TR 18 1 075 RD 12 975 DT 13	TR 8 TR 18 RD 12 DT 13 (RT 10)	3 100 1 100 1 100 RD 12	TR 8 RD 12 DT 13	-	-
Hin d II + Hin d III	5 300 TD 7 4 600 975 DT 13	DT 2 DT 13 TD 7 TT 8	5 200 1 100	TD 7 DT 13	-	-
Bam H I + Hin d II + III	3 500 2 650 BD 7 2 650 TB 11 1 150 TB 14 975 DT 13	BT 7 BD 7 TB 11 TB 14 DT 13	2 650 BD 7 1 200	nu	-	-
Hin d II	6 400 TT 5 4 800	nu	nu	nu	1 400 450	3 050
Hin d III	10 600	nu	nu	nu	-	-
Hin d II + Hae III	nu	nu	nu	nu	980 450 210	nu
Hae III	nu	nu	nu	nu	980 840	nu

Tabelle 6: Bestimmung der Längen einzelner Restriktionsfragmente (in Bp)

a = von rho⁻dD 22; c = BD 4; e = MM1A 9; f = A 11

und der Hybridisierung mit rho⁺ Fragmenten (in der Nomenklatur von Sanders et al., 1977)

b = von rho⁻dD 22; d = rho⁻BD 4

nu = nicht untersucht

Fragment (Nomenklatur nach Sanders et al. 1976)	Fragmentlängenbestimmung in Bp	
	0.7% Agarose	1.5% Agarose
Eco R I - Hin d II (TR18)	1 180	1 375
Bam H I -Hin d II(TB14)	1 025	1 190
Hin d II - Hin d III (DT13)	975	1 050
Hin d III - Eco R I (RD12)	1 075	1 300
Eco R I - Bam H I (BR11)	1 400	1 800
Eco R I - Eco R I (RR6)	3 250	3 400
Bam H I - Bam H I (BB5)	4 600	5 000

Tabelle 7: Vergleich der Fragmentlängenberechnung in zwei verschiedenen Agarosegelsystemen

Rho ⁻ Stämme	Genetische Marker	Restriktionsstellen						Reiterationsart	Länge der Sequenz (Bp)
		HpaII	AluI	HindII	BamHI	HaeIII	EcoRI		
		a)							
BD 4	M4216-M101	3	nu	-	1	3	1	palindrom	3 700
MM1A11	M101- M301	1	nu	1	-	1	-	tandem	780
MM1A9	G2590-M171	1	nu	1	-	1	-	palindrom	920
B 9	M3013-C103	3	nu	-	-	3	1	tandem	2 800
B 2	M2491-M521	1	-	-	1	1	1	tandem	2 800
A 19	M503-M761	-	+	-	1	-	-	palindrom	1 200
A 15	G5062-M181	-	+	-	1	-	-	tandem	1 800
A 11	M371-M181	-	+	1	1	-	-	tandem	3 100
B 1	M503-M2491	-	+	-	-	-	-	tandem	710

Tabelle 8: Art und Anzahl der enthaltenen Restriktionsstellen und Länge des Wildtypgenoms in

Zusammenhang mit dem Codierungsgehalt von rho⁻ Klonen

a) Untersucht nach dem Vorhandensein (+) bzw. Fehlen (-) des 210 Bp langen Fragments

nu = nicht untersucht

Rho ⁻ Mutanten	Enthaltende Exons				
	α	β	γ	δ	ϵ
dD 22	+	+	+	+	+
BD 4	o	+	+	+	o
MM1A9	o	o	o	+	-
MM1A11	o	o	o	+	-
B 9	o	o	+	o	o
B 2	o	+	-	o	o
A 19	o	+	o	o	o
B 1	o	o	o	o	o
A 15	o	+	o	o	o
A 11	-	+	o	o	o
B 12 ^{a)}	o	o	o	+	+
B 17 ^{a)}	o	o	o	o	+
A 6 ^{a)}	+	+	o	o	o
hb 2 ^{a)}	o	o	+	+	+
A 9 ^{a)}	+	o	o	o	o

Tabelle 9: Codierende Anteile der jeweiligen rho⁻ Mutanten

+ = gesamtes Exon enthalten

- = Exon nur teilweise enthalten

o = Exon nicht enthalten

a) nach Slonimski et al., 1978 a

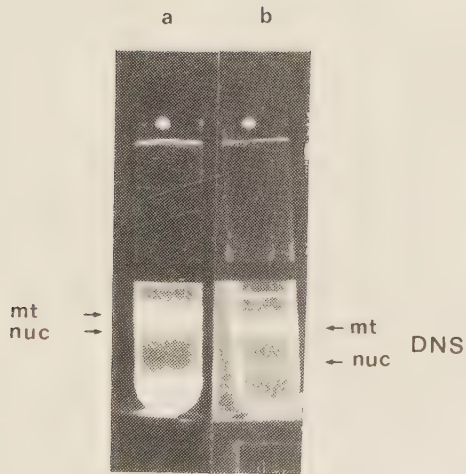


Abb. 1: Dichtezentrifugation von Hefe DNS

a: NaJ mit $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ Ethidium Bromid und

b: CsCl mit $1 - 2 \mu\text{g} / \text{ml}$ Bisbenzimid zum Sichtbarmachen der Nukleinsäuren

nuc DNS = Kern-DNS



Abb. 2: Verlauf der cRNS Synthese mit ^3H ATP- und ^3H UTP als Substrat und Wildtyp KL 14-4A als Vorlage

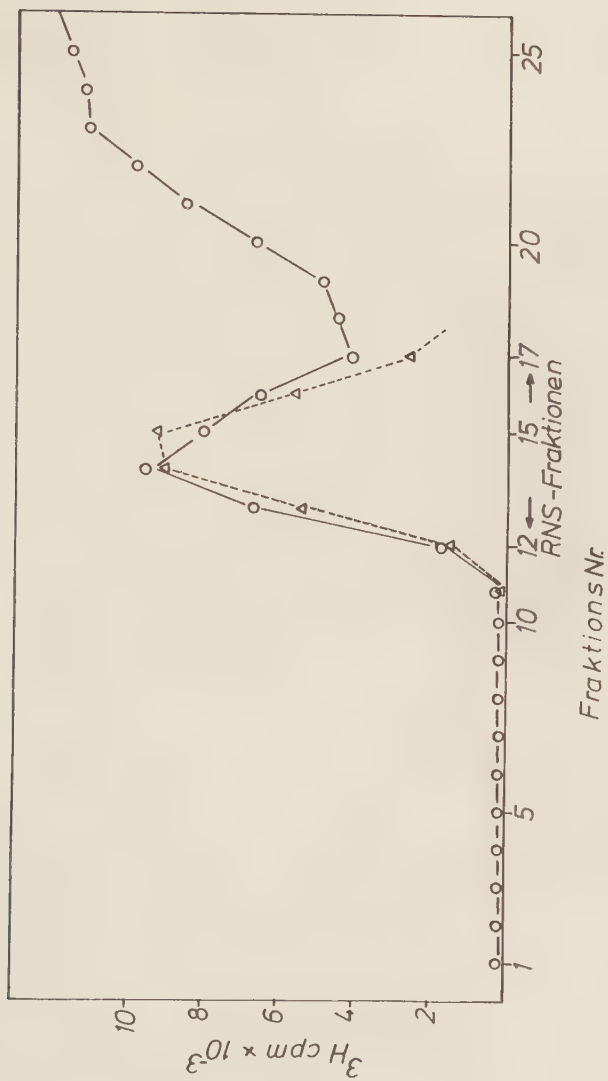


Abb. 3: Abtrennung der synthetisierten cRNS von nicht-eingebauten Triphosphaten über eine Sephadex G 100 Säule
 $\circ = ^3\text{H cpm} / \mu\text{l}$ jeder Fraktion ; $\Delta = ^3\text{H cpm} / \mu\text{l}$ jeder Fraktion TCA gefällt

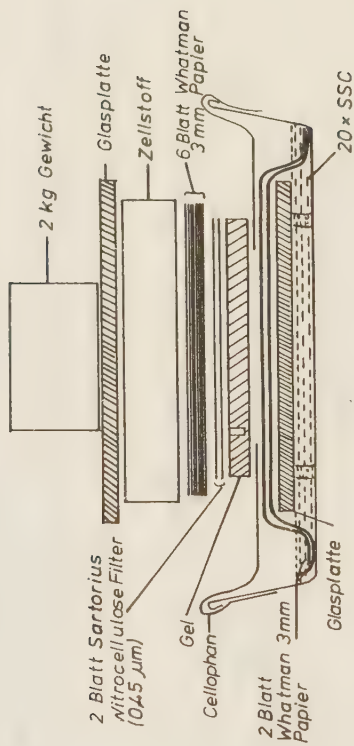
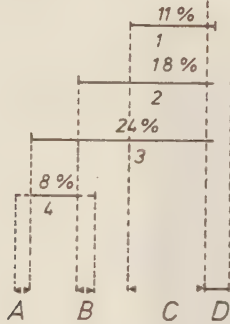


Abb. 4: Schematische Darstellung der Apparatur für die Übertragung von DNS aus Agarosegelen auf Nitrocellulose Papier (Southern, 1975 ; verändert nach Flavell, persönliche Mitteilung)

Länge der von der jeweiligen ρho^- zurückbehaltenen Wt-Sequenz

(% Hybridisierung $\rho\text{ho}^c\text{-RNS} | \rho\text{ho}^- \text{DNS}$) $D_\alpha D_\beta$



Genotyp des jeweiligen ρho^- Klonen

<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D_α</u>	<u>D_β</u>
0	0	+	+	0
0	+	+	+	0
0	+	+	+	0
+	+	0	0	0

Abb. 5: Theoretisches Beispiel für die Lokalisierung genetischer Marker auf einer Hybridisierungskarte

(Erläuterungen siehe 1.)

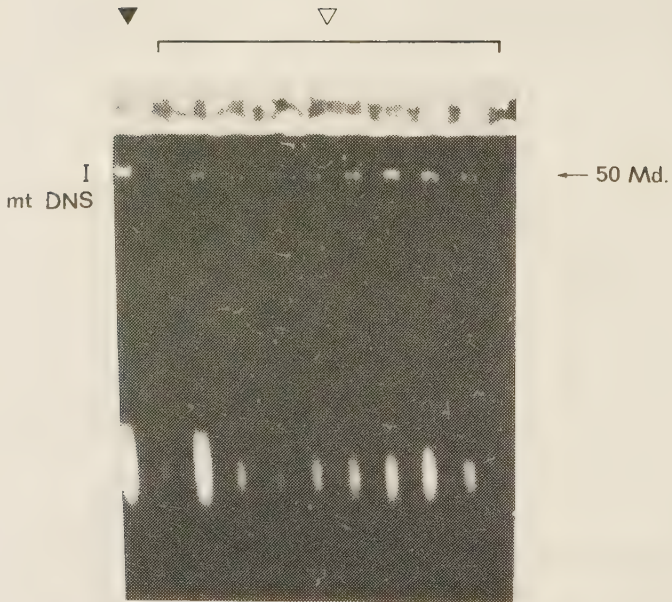


Abb. 6: Gelelektrophoretische Auftrennung
von Nukleinsäuren aus lysierten
Hefe-Mitochondrien

▶ = des Wildtyps

▷ = verschiedener ρ^- Mutanten

Md = Megadalton

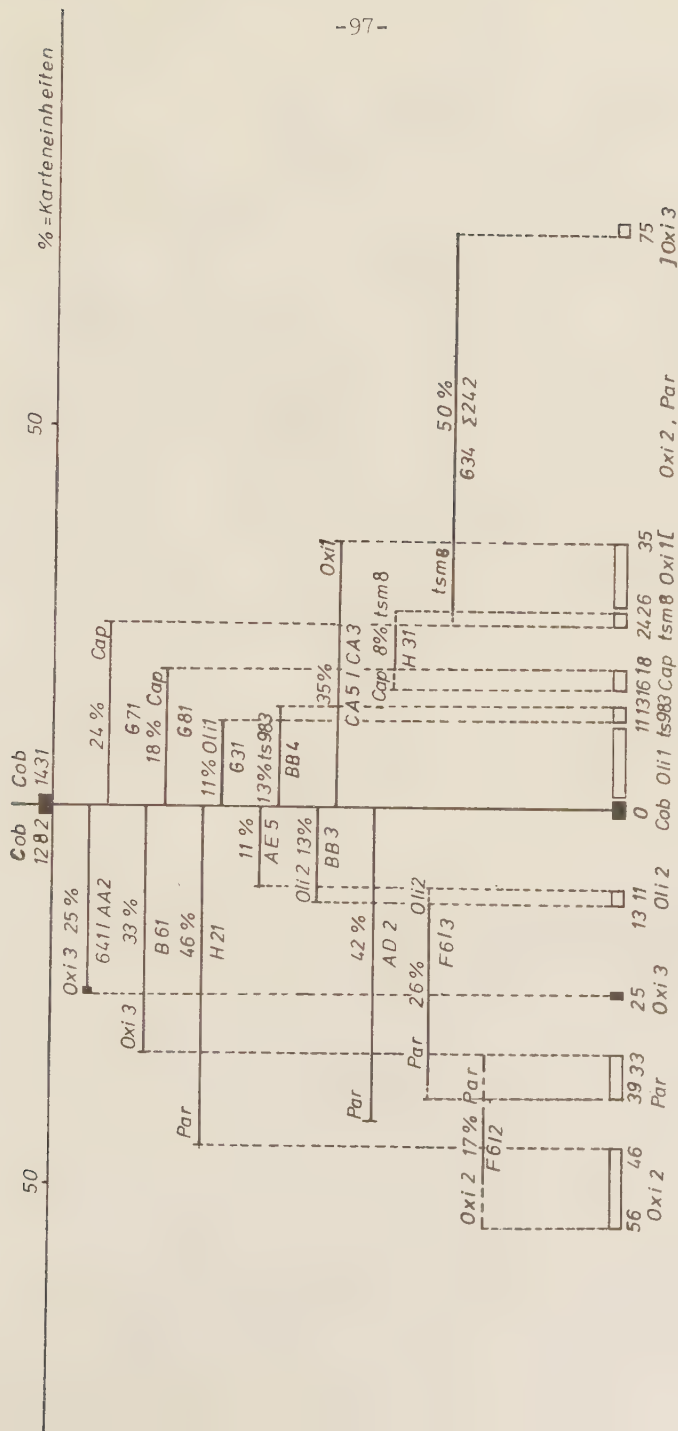
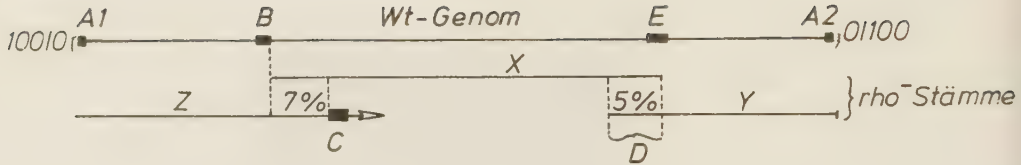


Abb. 7: Lokalisierung genetischer Marker auf einer linearen Karte mit Hilfe von rho⁺c-RNS/rho⁻DNS Hybridisierung (siehe 5. für Einzelheiten), und zwar der Loci für Biosynthese von Apocytocrom b = COB, der Cytochrom c Oxidase = Oxi 1,2,3, der Resistenz gegen Oligomycin = Oli 1,2, Paramomycin = Par, Chloramphenicol = Cap, der Stabilität der mtDNS = tsm 8 und ts 983



Genetische Marker:

Genotyp der rho Stämme:	A2	A1	B	C	D	E
X	0	0	0	+	+	+
Y	+	0	0	0	+	+
Z	0	+	+	0	0	0

Abb. 8: Hypothetisches Beispiel für die Lokalisierung genetischer Marker auf einer biochemischen Karte mit Hilfe von ρ^- cRNS / ρ^- DNS Hybridisierung (siehe dazu 5.2.)

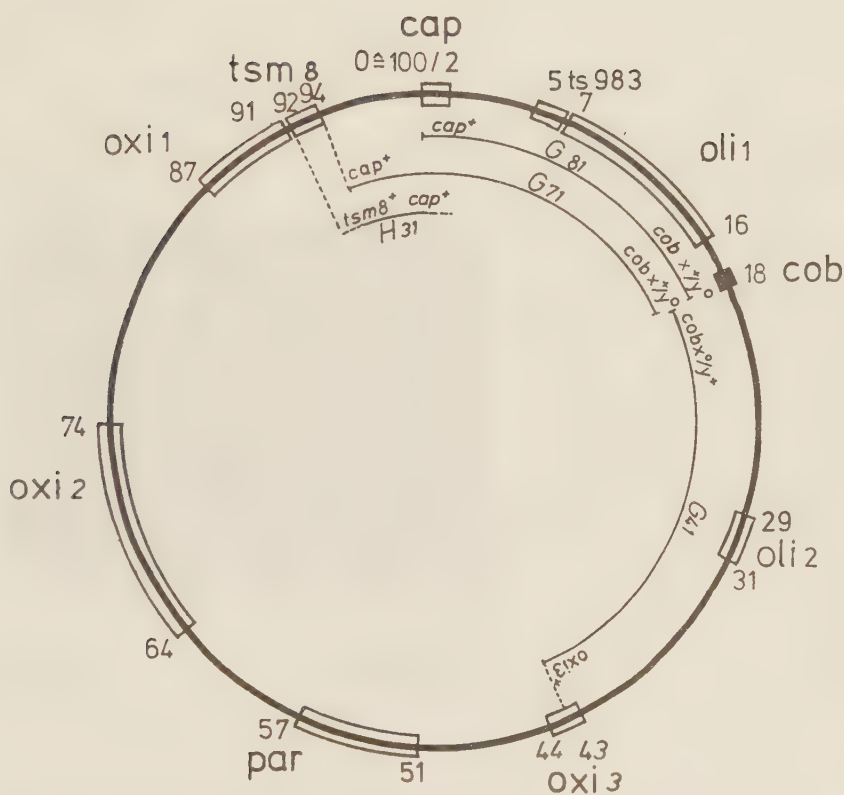


Abb. 9: Zirkuläre Karte des mitochondrialen Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* erstellt nach Hybridisierungsanalysen von ρ^+ (ρ^-) c-RNS/ ρ^- DNS (siehe Tabelle 4)

Zirkel: Lokalisierung der Loci innerhalb der offenen Kästchen für: cap = Chloramphenicol-, par = Paramomycin-, oli 1,2 = Oligomycinresistenz

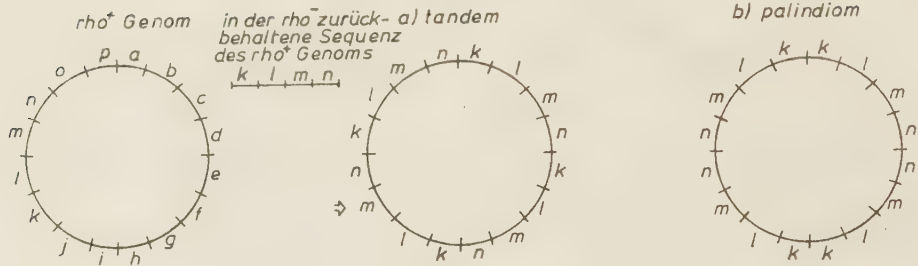
oxi 1,2,3 = Genorte, welche die Biosynthese der Cytochrom c Oxidase betreffen

tsm8, ts983 = Genorte, welche die Stabilität der mtDNS beeinflussen

cob = Locus, der die Biosynthese des Cytochroms b betrifft

Im Inneren des Zirkels ist als Beispiel für die Lokalisierung genetischer Marker mit Hilfe von ρ^+ c-RNS/ ρ^- DNS Hybridisierung die Bestimmung der Loci oxi3 und tsm8 eingezeichnet (vgl. Abb. 7)

Möglichkeiten der Reiteration im ρ^- Genom:



Restriktion mit 1 Enzym X

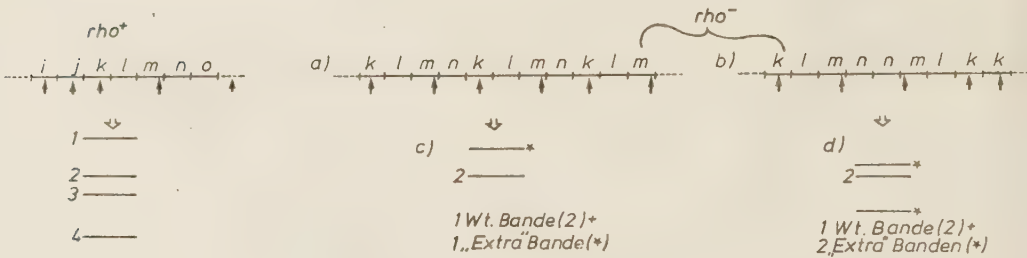


Abb. 10: Schematische Darstellung der Reiteration eines ρ^- Genoms
(Erläuterungen siehe 7.1.)

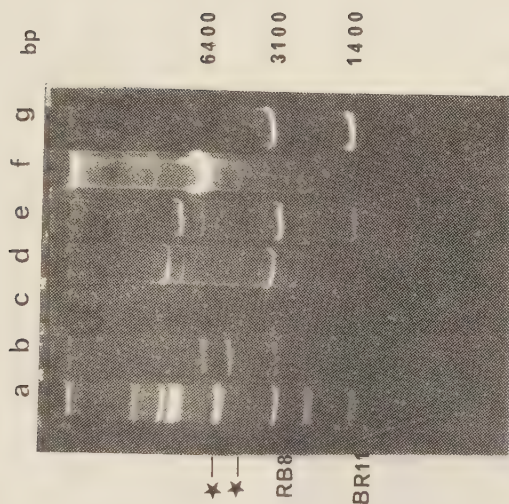


Abb. 12: Gelelektrophoretische Auftrennung in

0, 7 % Agarose

a: KL 14 - 4 A (BamHI + EcoRI)

b: S 6 (BamHI + EcoRI) d: S 4 (EcoRI)

e: S 4 (BamHI + EcoRI) f: BD 4 (BamHI)

g: BD 4 (BamHI + EcoRI) c: nicht verwendet

* = "junction" Bande

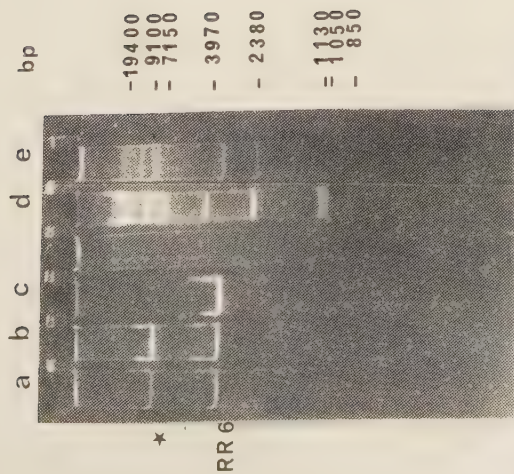


Abb. 11: In 0, 7 % Agarose aufgetrennte EcoRI-

Spaltprodukte von:

a + b: dD 22; c: BD 4; d: P 22 (Marker)

e: KL 14 - 4 A

* = "junction" Bande

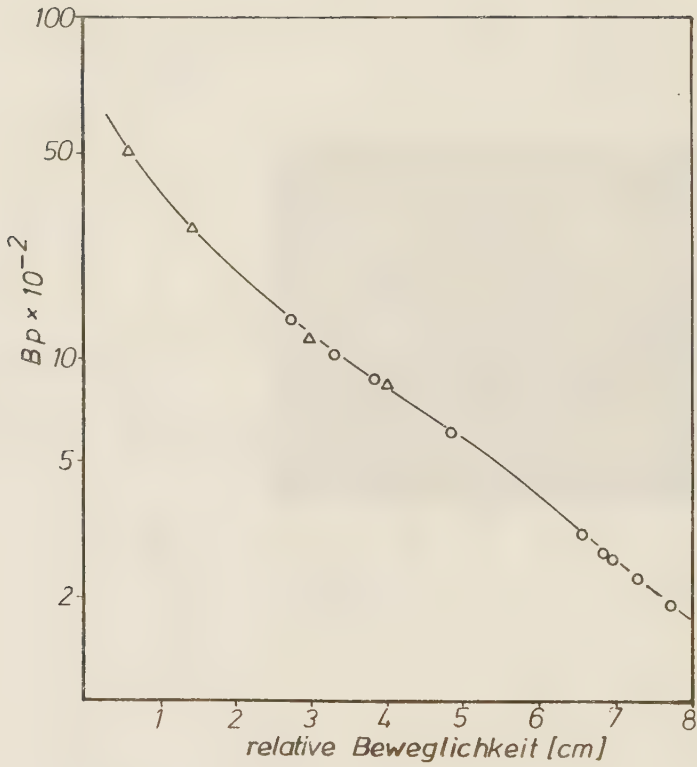


Abb. 13: Eichkurve zweier verschiedener Marker-DNS im 1,5 % Aggrosegel

Δ = P22 EcoRI gespalten

o = $\Phi X 174$ HaeIII gespalten

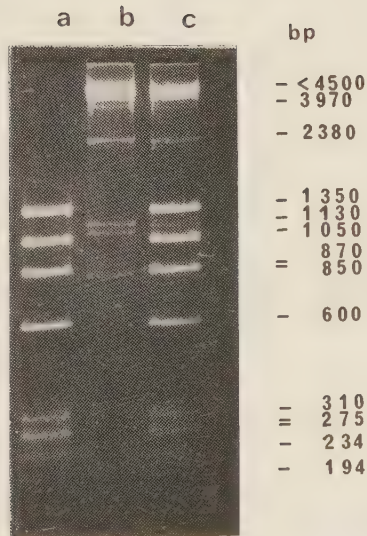


Abb. 14: Gelelektrophoretische Auftrennung von Marker-
DNS in 1,5% Agarose (siehe auch Abb.13)
a: Φ X 174 (HaeIII) b: P 22 (EcoRI)
c: Φ X 174 (HaeIII) + P 22 (EcoRI)

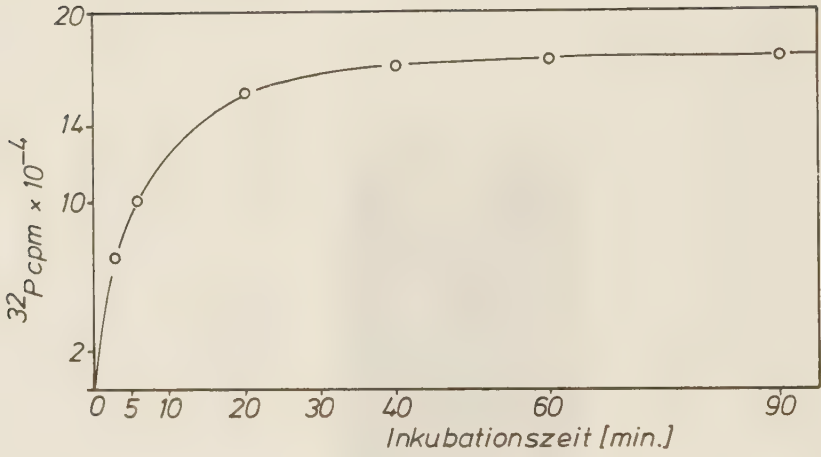


Abb. 15: Einbaurrate von ^{32}P Nukleotiden in KL14-4 A mtDNS
("Nick"Translationsrate)

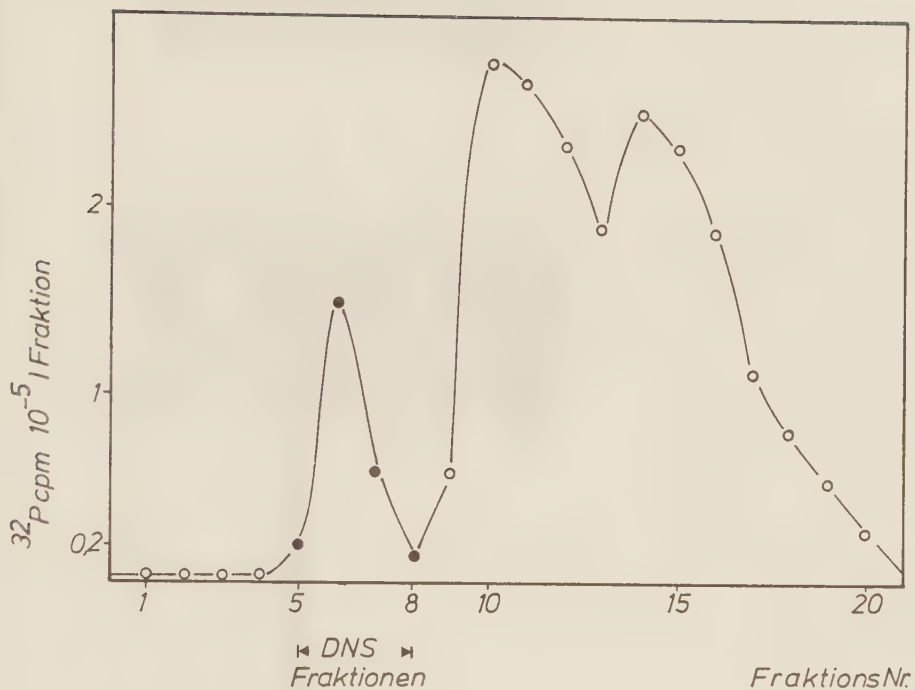


Abb. 16: Abtrennung "nick" translaterter DNS von den nicht-eingebauten Triphosphaten über eine Sephadex G 50 Säule (Cerenkov Zählung der einzelnen Fraktionen)

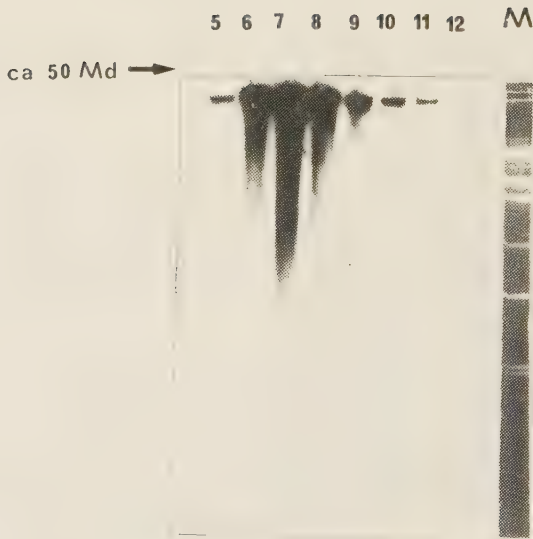


Abb. 17: Gelelektrophoretische Auftrennung fraktionierter

"nick translaterter" dD22 mtDNS in 1% Agarose

Von Fraktion (5 - 12) wurden je 5 μ l DNS aufgetragen

M: Marker DNS P 22 (EcoRI gespalten)

Md = Megadalton

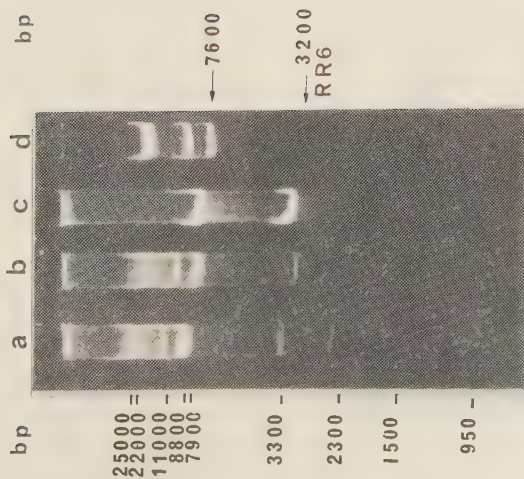


Abb. 18: Gelelektrophoretische Auftrennung der Eco R I

Spaltprodukte in 0, 7% Agarose

a: RM 590-9D; b: RM 511-4A; c: dD 22
d: P 22 (Marker)

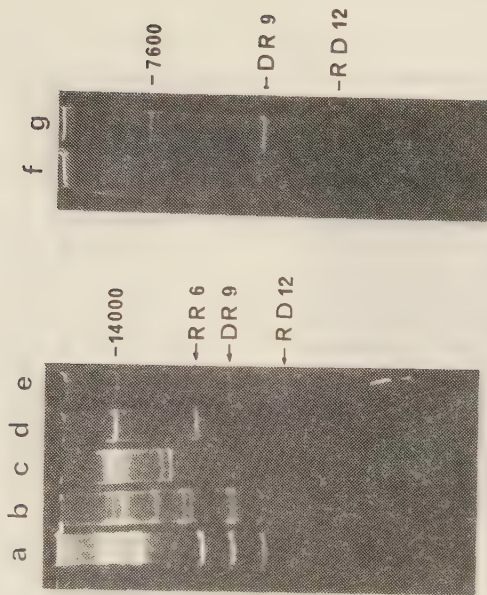


Abb. 19: Gelelektrophoretische Auftrennung in 0, 7% Agarose

a: KL 14-4A (EcoRI); b: KL 14-4A (EcoRI+HindIII)

c: KL 14-4A (BamHI); d: S 1 (EcoRI); e: S 1 (EcoRI+HindIII); f: KL 14-4A (EcoRI+HindIII); g: dD 22 (EcoRI+HindIII)

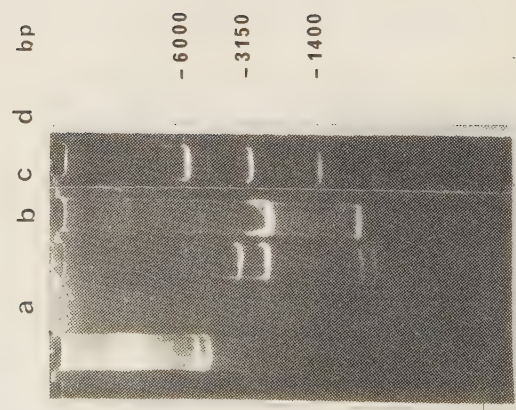


Abb. 20: Gelelektrophoretische Auftrennung in 0,7% Agarose (siehe dazu Tabelle 6)
a: RM 590-9D (BamHI); b: dD 22 (BamHI+HindII+III);
c: BD 4 (BamHI+HindII+III); d: dD 22 (BamHI+EcoRI)

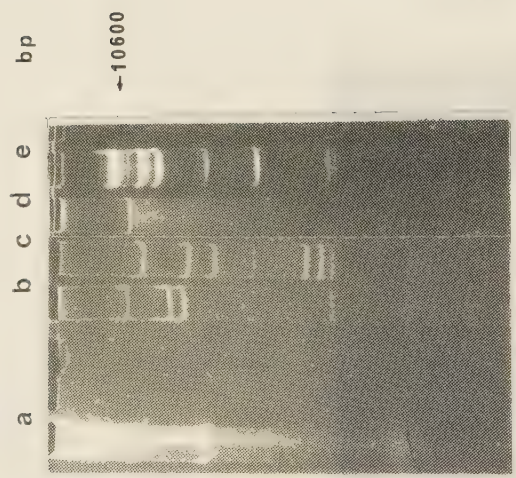


Abb. 21: Auftrennung der Spaltprodukte von rho⁻ dD 22 in 0,7% Agarose (siehe dazu Tabelle 6) mit
a: EcoRI; b: HindII+III; c: EcoRI+HindII+III
d: HindIII gespalten. e: Marker DNS P 22 mit EcoRI restringiert

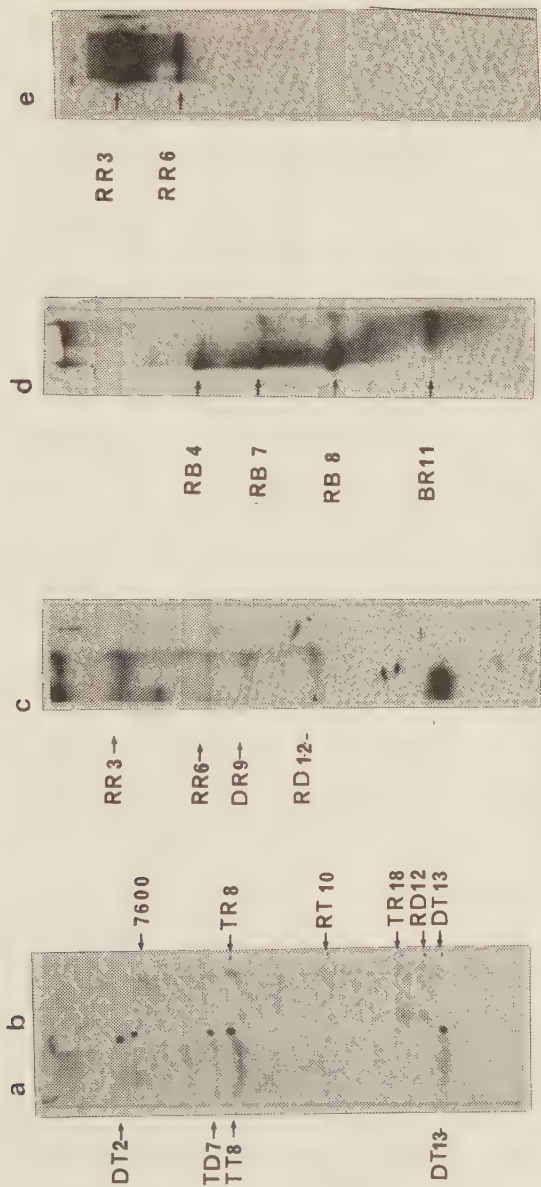


Abb. 22: Autoradiographie der Hybridisierung filtergebundener Restriktionsfragmente des Wildtyps

KL 14-4 A mit "nick"translatierter DNS aus rho⁻DD22 nach Restriktion mit

a: HindII + III; b: HindII + III+EcoRI; c: HindIII + EcoRI; d: BamHI + EcoRI; e: EcoRI

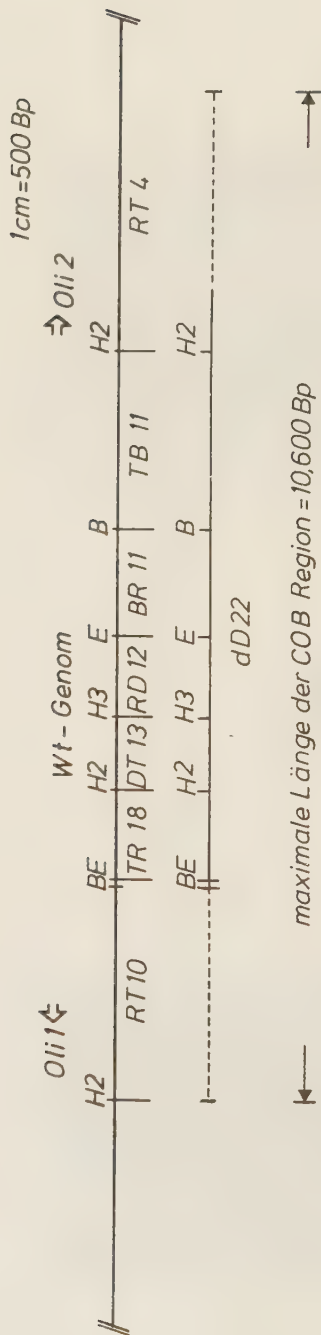


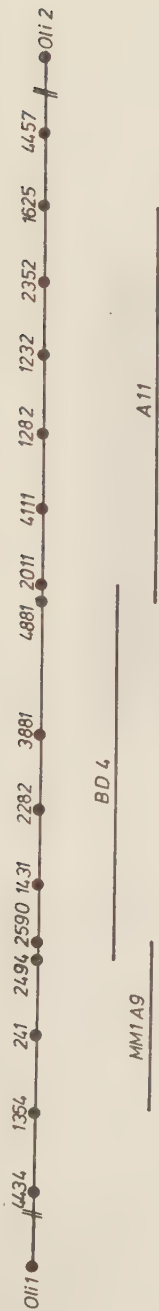
Abb. 23: Bestimmung der Lage und maximalen Länge der COB-Region mit Hilfe von Restriktionsanalysen des rho Klonen dD22

obere Linie: Ausschnitt aus der Restriktionskarte des Wildtypgenoms (Bezeichnungen der Restriktionsfragmente nach Sanders et al., 1977)

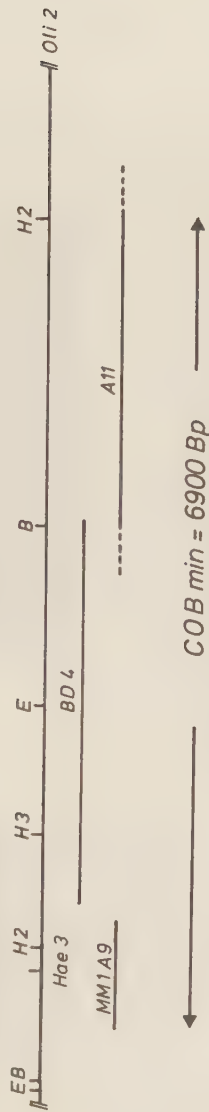
H 2 = HindIII; B = BamHI; E = EcoRI; H 3 = HindIII

darunter: Restriktionskarte der DNS von rho dD22; Variabilität der Ausdehnung der COB-Region auf Grund der "tandem"Reiteration der DNS des rho Klonen ist gestrichelt angegeben

a) Genetische Karte



b) Restriktionskarte



COB min = 6900 Bp

Abb. 24 a: Genetische Karte der COB Region nach Schweyen et al (1977) mit Angabe der in drei rho-

Klonen enthaltenen Marker

Abb. 24 b: Restriktionskarte der COB-Region mit Lokalisierung der DNS dieser drei (siehe a) rho-Klone und der daraus resultierenden Minimaaleingrenzung der COB-Region (Bezeichnungen vgl. Abb. 23)

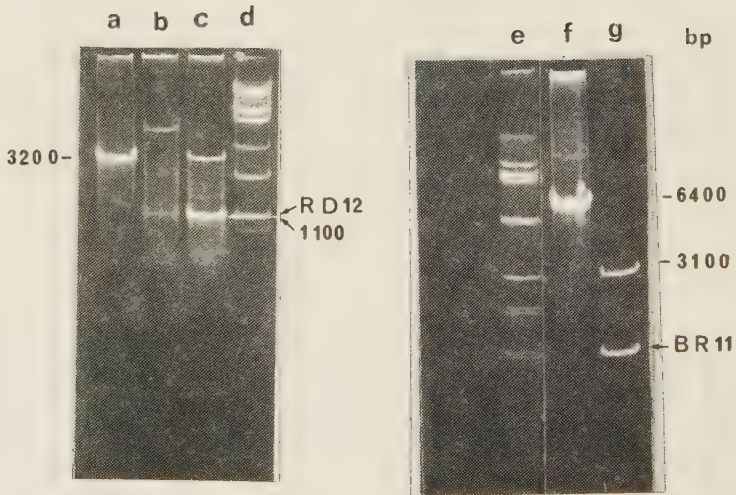
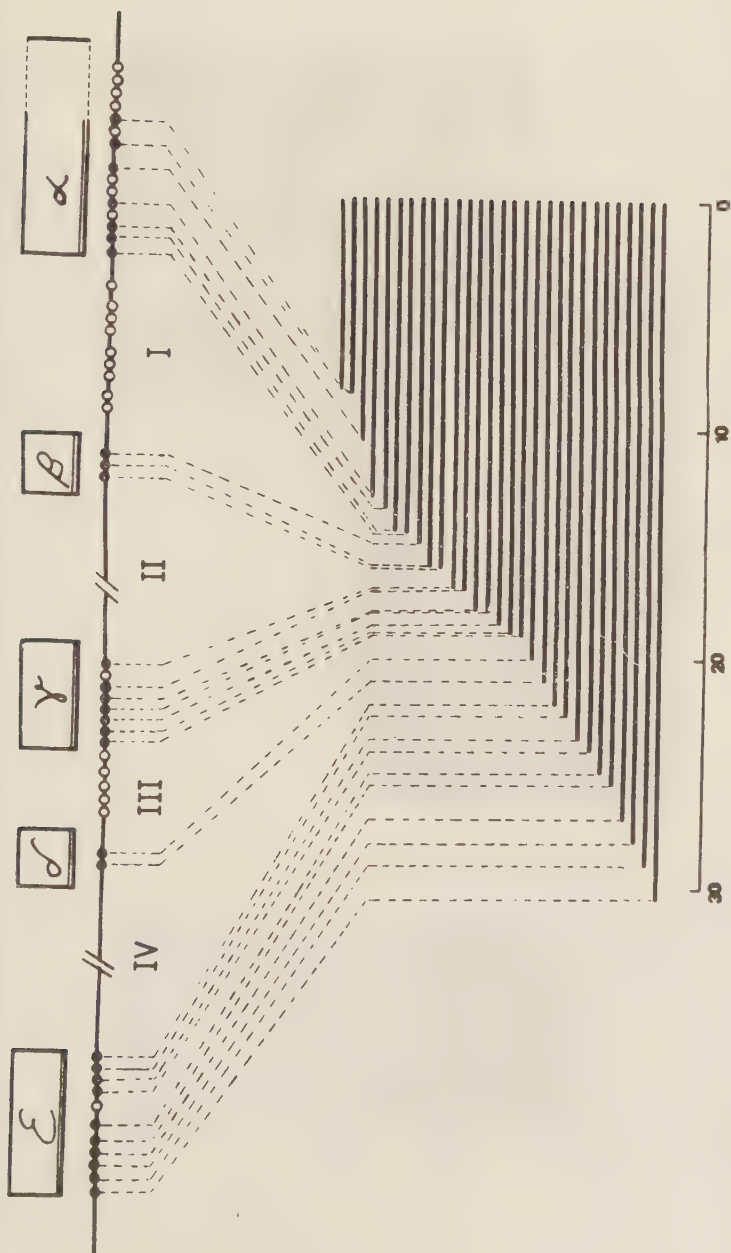


Abb. 25: Auftrennung der Spaltprodukte von ρho^- BD 4 in 0,7% Agarose (siehe dazu Tabelle 6) mit
a: EcoRI; b: HindII+III; c: EcoRI+HindII+III
f: BamHI; g: BamHI+EcoRI; d: Marker DNS P 22 (EcoRI); e: KL14-4A (BamHI+EcoRI)



Auftretendes Molekulargewicht (Kilodalton) von Mutanten-Polypeptiden in SDS Polyacrylamid-Gelen

Abb. 26: Zuordnung der Molekulargewichte von Apocytochrom b Fragmenten zu der genetischen Karte
(nach Haid et al., 1979, und Bechmann, persönliche Mitteilung)

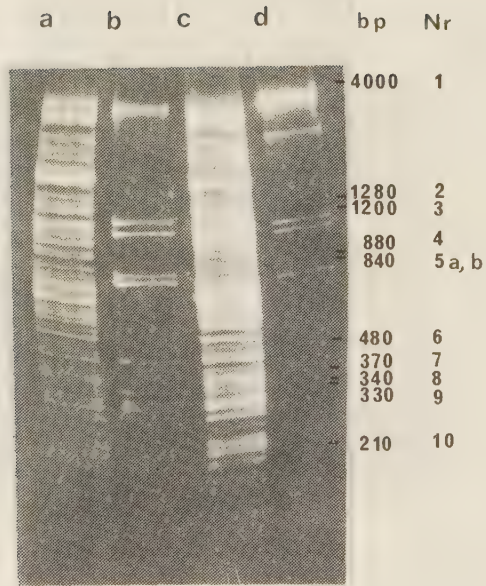


Abb. 27: Gelelektrophoretische Auftrennung der Hpa II
Spaltprodukte in 1,5% Agarose
a: KL 14-4A; b: dD 22; c: RM 511-4A;
e: Marker DNS P 22 EcoRI gespalten

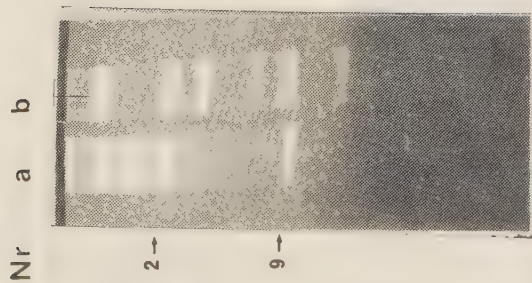


Abb. 28: Gelelektrophoretische Auftrennung der Hpa II
Spaltprodukte in 1,5% Agarose
a: BD 4; b: dD 22

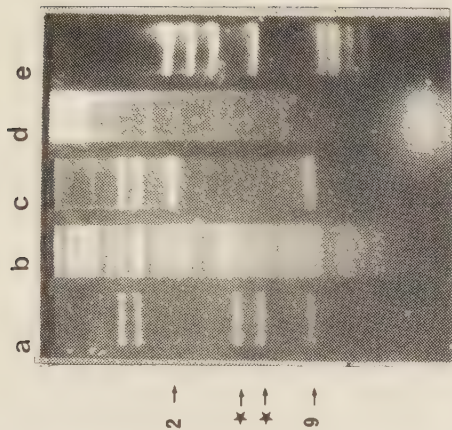


Abb. 29: Gelelektrophoretische Auftrennung der Hpa II
Spaltprodukte in 1,5% Agarose; Lokalisierung
der Hpa-Bande 2
a: BD 4 (zusätzlich EcoRI); b: KL 14-4A;
c: BD 4; d: Verunreinigte mt DNS; e: Marker
DNS ϕ X 174 HaeIII gespalten

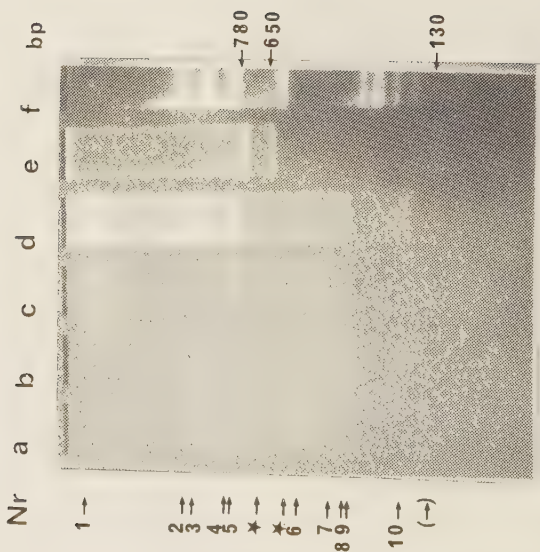


Abb. 30: Gelelektrophoretische Auftrennung in 1,5% Agarose

Lokalisierung der Banden 9; 3; 5a und 6

Nachspaltung mit HpaII: von RR6 (a); dD 22 EcoRI Bande

(b); dD 22 EcoRI "junction" Fragment (c)

Spaltung von dD 22 mit HpaII (d); Nachspaltung der

Hpa II Bande von MM1A11 mit HindII (e); Marker

DNS ϕ X 174 mit Hae III gespalten

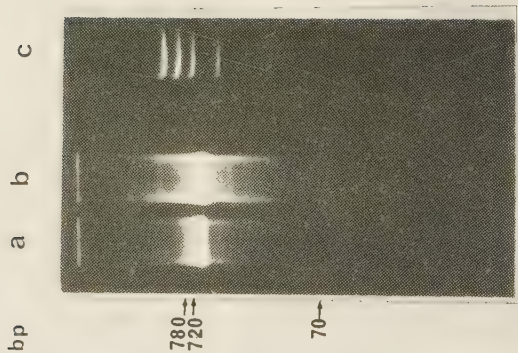


Abb. 31: Auftrennung der Spaltprodukte von MM1A11 in 1,5%

Agarose

a: HpaII; b: HpaII+HaeIII; c: Marker DNS ϕ X 174

HaeIII gespalten

HpaII - Karte:

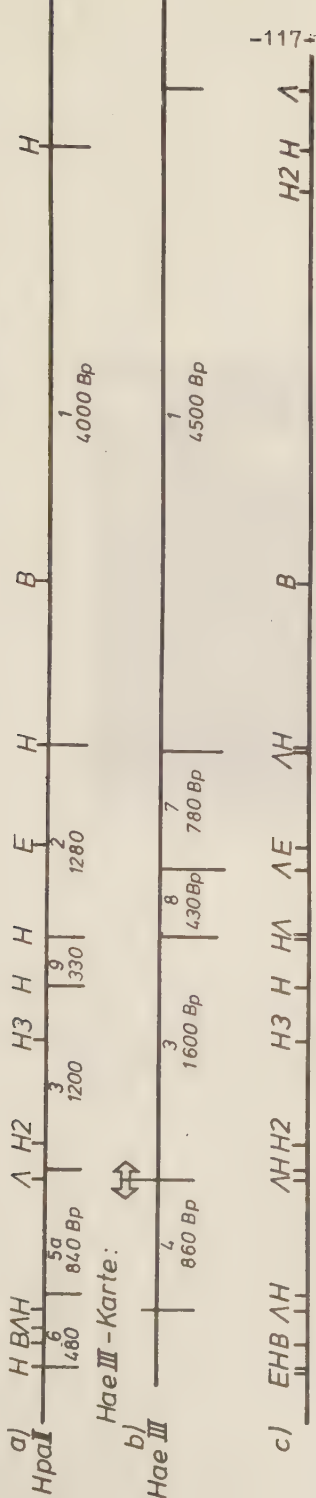


Abb. 32: Restriktionskarte der COB-Region

- a) HpaII Karte, eingefügt einige Spaltstellen anderer Enzyme die zur Kartierung verwendet wurden (siehe dazu 12.1.)
- b) HaeIII Karte (nach Slonimski et al., 1978a); Position und Länge der Fragmente sind an das 1,5% Agarosegelsystem (siehe dazu 12.1.) angeglichen
- c) Vollständige Karte der COB-Region (a + b)

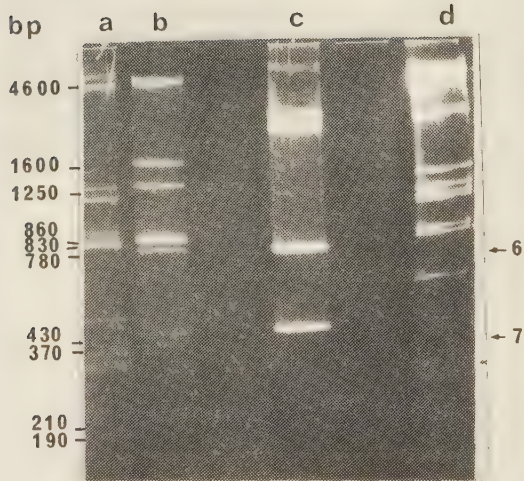


Abb. 33: Gelelektrophoretische Auftrennung in 1,5% Agarose
a: dD 22 (HpaII); b: dD 22 (HaeIII); c: BD 4 (HaeIII);
d: Marker DNS ϕ X 174 mit HaeIII + P 22 mit
EcoRI gespalten

Restriktionskarte der COB-Region

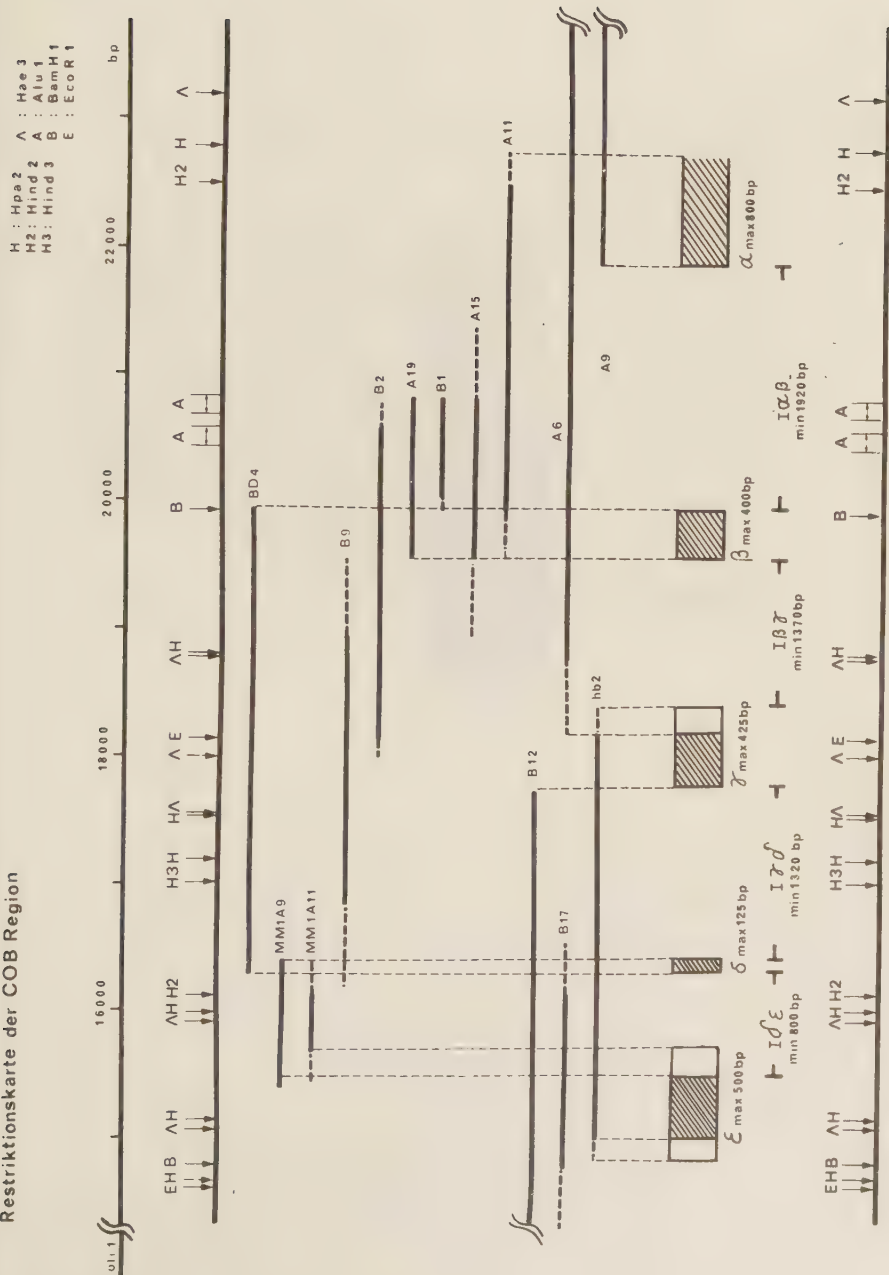


Abb. 34: Restriktionskarte der COB-Region und Eingrenzung der Exon- und Intron-Bereiche

Abb. 34: Oberste Linie: Position der COB-Region innerhalb des Wildtypgenoms (KL 14-4 A) (0 Bp = SalI Schnittstelle gezeichnet im Uhrzeigersinn)

2. Linie von oben: Restriktionskarte (siehe Abb. 32c)

darunter: Lokalisierung einzelner ρ^- durch Restriktionskartierung (Restriktionsanalysen in Zusammenarbeit mit C. Schmelzer erstellt; B12, B17, A6, A9, hb2 von der Restriktionskarte von Slonimski et al. (1978 a) übernommen. Durchgezogene Linie: gesicherte Position der DNS eines ρ^- Klonen; gestrichelte Linie: maximal mögliche Ausdehnung der DNS-Sequenz eines ρ^- Klonen; auf Grund von "tandem" Reiteration nicht exakt festlegbar

unterste Linie: Eingrenzung der codierenden Sequenzen (α - ϵ); gestreift: wahrscheinliche Position

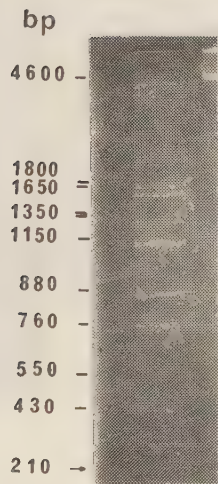


Abb. 35: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktions-
Fragmente von dD22 nach Behandlung mit AluI

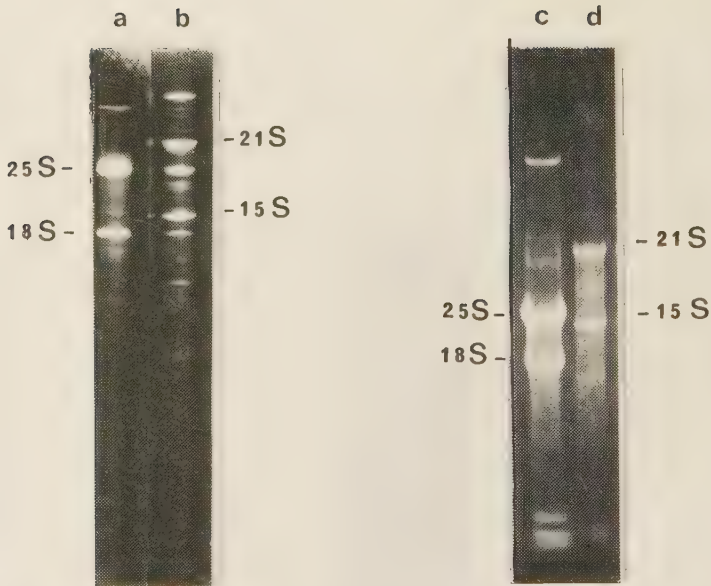


Abb. 36: Vergleichende RNS-Gelelektrophorese

a, b 1, 5% Harnstoff-agarosegel

c, d 1, 5% Methylmercuri-agarosegel

a: cytoplasmatische RNS; b: mitochondriale RNS

c: cytoplasmatische RNS; d: mitochondriale RNS

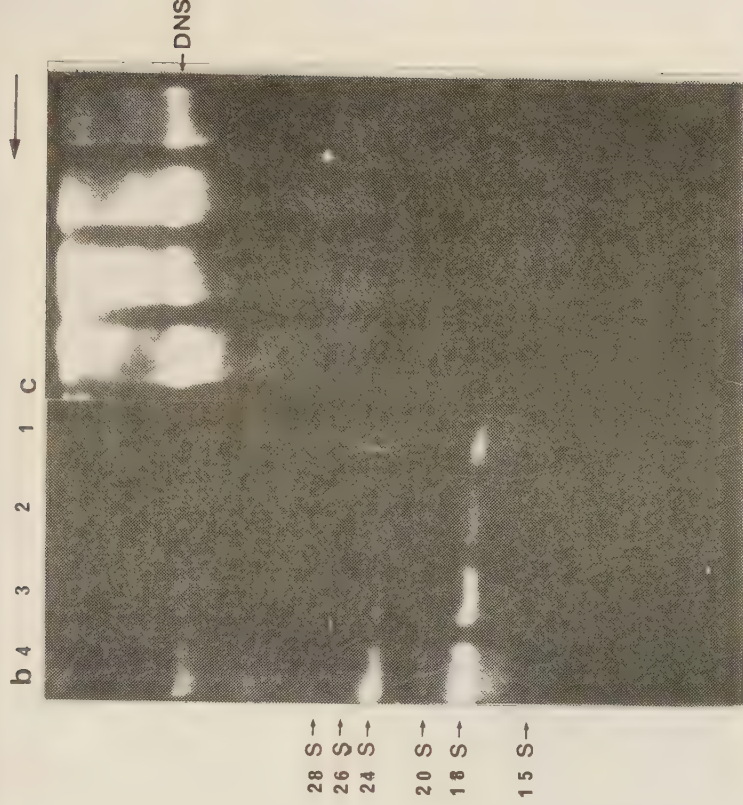


Abb. 37 a: Gelelektrophoretische Auftrennung von mt RNS des Wildtypstammes 777-3A in verschiedenen Konzentrationen
 → steigende RNS Konzentration

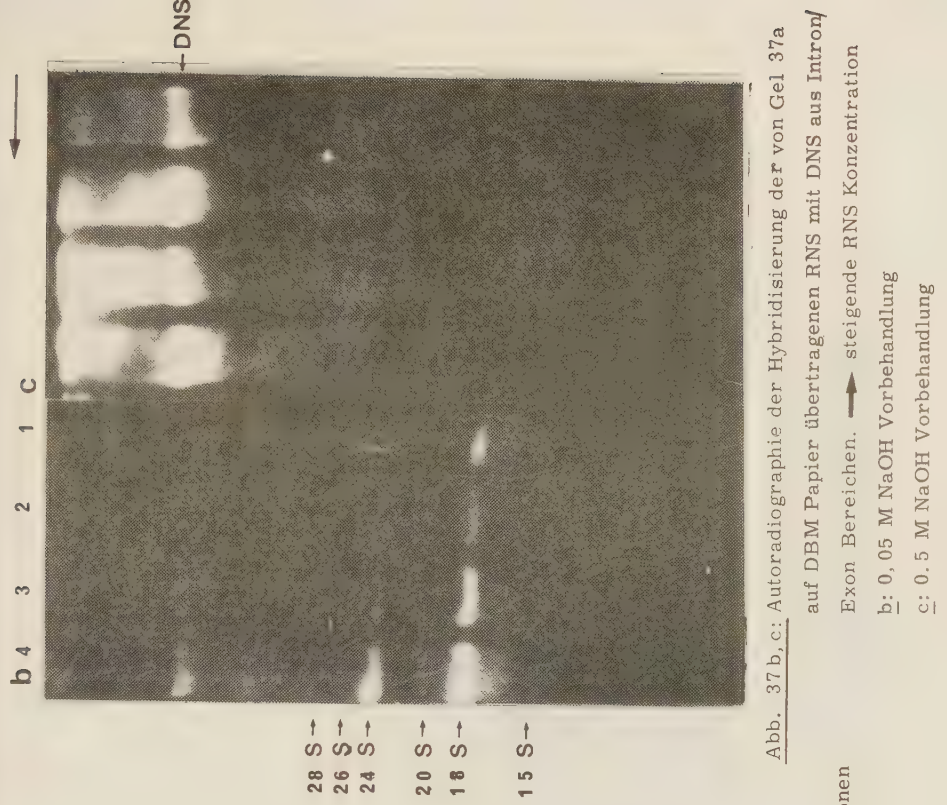


Abb. 37 b, c: Autoradiographie der Hybridisierung der von Gel 37a auf DBM Papier übertragenen RNS mit DNS aus Intron/Exon Bereichen. → steigende RNS Konzentration
 b: 0, 05 M NaOH Vorbehandlung
 c: 0, 5 M NaOH Vorbehandlung

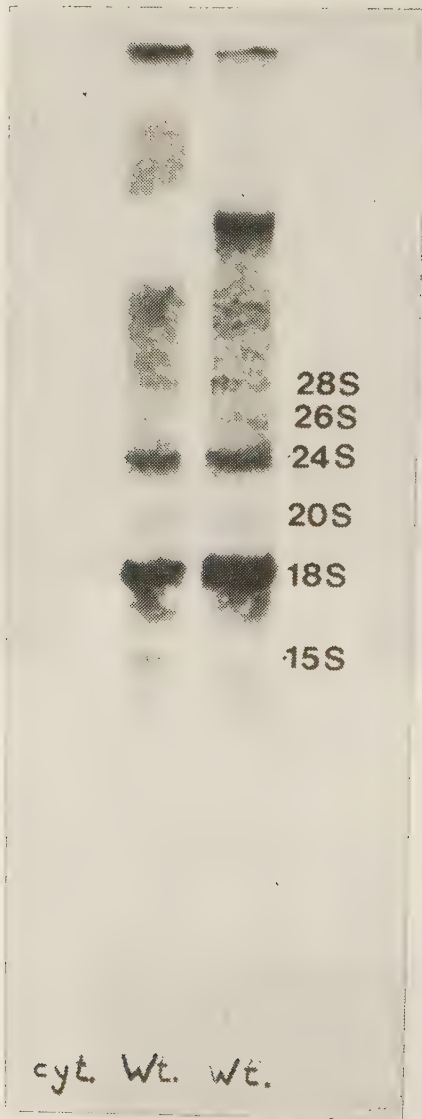


Abb. 37d: Vergleich der Hybridisierung cyt. RNS und mt RNS des Wildtyps 777-3A mit DNS der COB-Region aus Intron- und Exonbereichen

cyt = cyt. RNS; Wt = mt RNS des Wildtyps

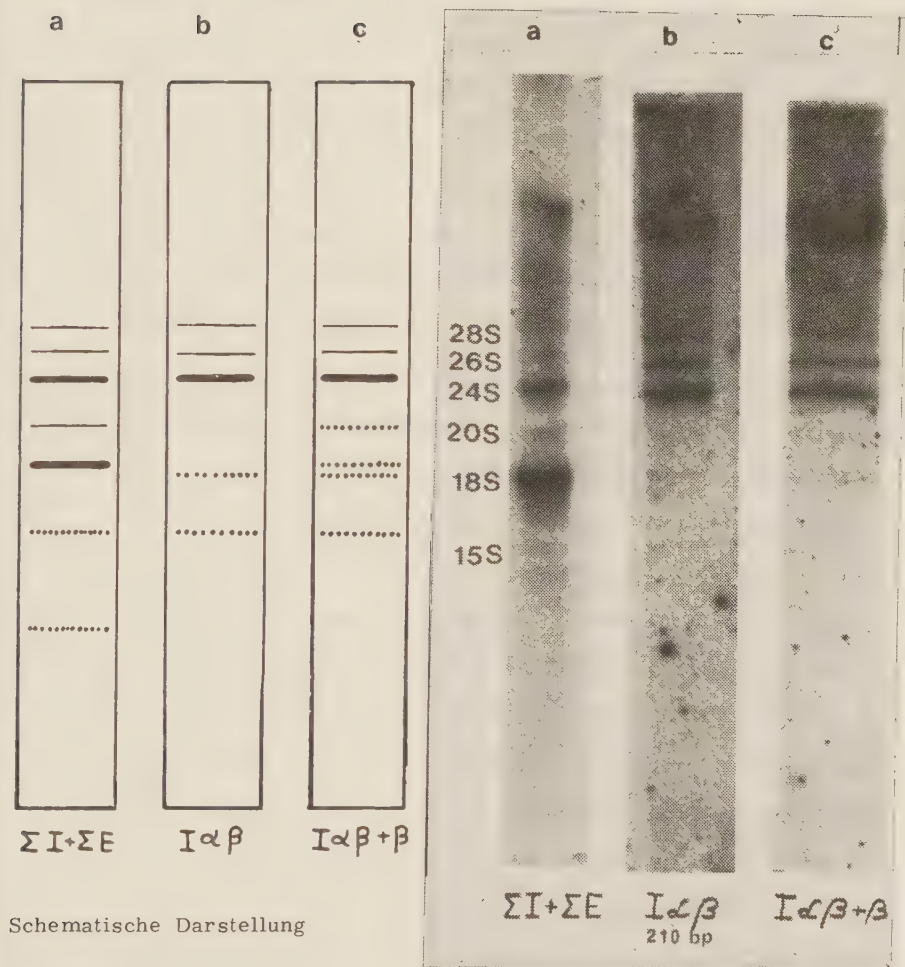


Abb. 38: Hybridisierung von Wildtyp RNS des Stammes 777-3 A mit DNS aus verschiedenen Sequenzen der COB-Region (rho⁻ Stämme oder Restriktionsfragmente)

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- Alexander, N.J., Vincent, R.D., Perlman, P.S.: Genetic and biochemical analysis of the COB region in *S. cerevisiae*
In: 9th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Rochester, pp. 30 (1978)
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., Stark, G.R.: Method for detection of specific RNA's in agarose gels by transfer to diazobenzylxymethyl-paper and hybridization with DNA probes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350 - 5354 (1977)
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., Parker, B.A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G.R., Wahl, G.M.: Detection of specific RNA's or specific fragments of DNA by fractionations in gels and transfer to diazobenzylxymethyl-paper
Im Druck (1979)
- Bailey, J.M., Davidson, N.: Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis
Analyt. Biochemistry 70, 75 - 85 (1976)
- Bernardi, G., Piperno, G., Fonty, G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. I. Preparation and heterogeneity of mitochondrial DNA
J. Mol. Biol. 65, 173 - 179 (1972)
- Bernardi, G.: Molecular genetics of yeast mitochondria
In: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Thomas, D.Y., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 69 - 84 (1976)

- Bernardi, G., Prunell, A., Fonty, G., Kopecka, H., Strauss, F.:
The mitochondrial genome of yeast: Organization, evolution
and the petite mutation
In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C.,
Kroon, A.M., eds.) Amsterdam: North-Holland pp. 185 - 198
(1976)
- Bishop, J.O.: Molecular hybridization of ribonucleic acid with
a large excess of deoxyribonucleic acid
Biochem. J. 126, 171 - 185 (1972)
- Blamire, J., Cryer, D.R., Finckelstein, D.B., Marmur, J.:
Sedimentation properties of yeast nuclear and mitochondrial
DNA
J. Mol. Biol. 67, 11 - 24 (1972)
- Bolotin-Fukuhara, M., Faye, G., Fukuhara, H.: Localization
of some mitochondrial mutations in relation to transfer
and ribosomal RNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*
In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C.,
Kroon, A.M., eds.) Amsterdam: North-Holland pp. 243 - 250
(1976)
- Bolotin-Fukuhara, M., Faye, G., Fukuhara, H.: Temperature-
sensitive respiratory-deficient mitochondrial mutations:
isolation and genetic mapping
Molec. gen. Genet. 152, 293 - 305 (1977)
- Borst, P., Bos, J.L., Grivell, L.A., Groot, G.S.P., Heyting,
C., Moorman, A.F.M., Sanders, J.P.M., Talen, J.L. van Kreijl,
C.F., van Ommen, G.J.B.: The physical map of yeast mito-
chondrial DNA Anno 1977 (A Review)

- In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 213 - 254 (1977)
- Bos, J.L., Heyting, C., Borst, P., Arnberg, A.C., van Bruggen, E.F.J.: An insert in the single gene for the large ribosomal RNA in the yeast mitochondrial DNA
Nature 275, 336 - 337 (1978)
- Burger, G., Lang, B., Backhaus, B., Wolf, K., Bandlow, W., Kaudewitz, F.: Mutations to drug resistance in the COB region of the mitochondrial genome
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 205 - 212 (1977)
- Butow, R.A., Vincent, R.D., Strausberg, R.L., Zanders, E., Perlman, P.S.: Genetic, physical and biochemical analysis of a mitochondrial gene
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 317 - 337 (1977)
- Cabral, F., Solioz, M., Deters, D., Rudin, Y., Schatz, G., Clavilier, L., Goudrinski, O., Slonimski, P.P.:
Effect of mitochondrial mutations on cytochrom c oxidase in yeast
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 401 - 414 (1977)

- Claïsse, M.L., Spyridakis, A., Slonimski, P.P.: Mutations at anyone of the three unlinked mitochondrial genetic loci BOX 1, BOX 4 and BOX 6, modify the structure of cytochrom b polypeptide(s)
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaude-witz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 337 - 344 (1977)
- Collins, J.: Gene cloning with colE1 plasmid and colE1 chimera plasmids
Molec. gen. Genet. 357, 311 - 312 (1976)
- Darnell, E.J.: Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eucaryotic cells
Science 202, 1257 - 1260 (1978)
- Denhardt, D.T.: A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641 - 646 (1966)
- Doxiadis, I.: Charakterisierung der mitochondrialen DNS aus *Saccharomyces cerevisiae*: Rho⁻ Bildung in Temperatur sensiblen Mutanten
Dissertation, München (1978)
- Faye, G., Fukuhara, H., Grandchamp, C., Laskowska, J., Michel, F., Casney, L., Getz, G.S., Locker, J., Rabinowitz, M., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P., Slonimski, P.P.: Mitochondrial nucleic acids in petite colonie mutants: deletion and repetition of genes
Biochimie 55, 779 - 792 (1973)

- Faye, G., Dennebouy, N., Kujawa, Ch., Jacq, C: Inserted sequences in the mitochondrial 23 S ribosomal RNA gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Molec. gen. Genet. 168, 101 - 109 (1979)
- Gillespie, D., Spiegelman, S.: A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane
J. Mol. Biol. 12, 829 - 842 (1965)
- Gillham, N.: Genetic analysis of the chloroplast and mitochondrial genomes
Annu. Rev. Genet. 8, 347 - 393 (1974)
- Grivell, L.A., Hensgens, L.A.M., Sonnenberg, A.: Fine structure mapping of the COB-Oli 1 region on yeast mitochondrial DNA
In: 9th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Rochester, pp. 29 (1978)
- Grivell, L.A., Arnberg, A.C., Boer, P.H., Borst, P., Bos, J.C., van Bruggen, E.F.J., Groot, G.S.P., Hecht, N.B., Hensgens, L.A.M., van Ommen, G.J.B., Tabak, H.F.: Transcripts of yeast mitochondrial DNA and their processing
In: Extrachromosomal DNA, ICN-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology Vol. 15, (Cummings, D., Borst, P., Dawid, I., Weisman, S., Fox, C.F., eds.) New York (1979) im Druck
- Grosch, G., Doxiadis, I., Lang, B., Schweyen, R.J., Kaude-witz, F.: A one-step methode for ρ^+ cRNA/ ρ^- DNA hybridization in mapping of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*

- In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 425 - 432 (1977)
- Haid, A.: Der Codierungs-Gehalt der COB-Region der mitochondrialen DNS von *Saccharomyces cerevisiae*
Dissertation München (1979)
- Haid, A., Schweyen, R.J., Bechmann, H., Kaudewitz, F., Solioz, M., Schatz, G.: The mitochondrial COB region in yeast codes for apocytochrom b and is mosaic
Eur. J. Biochem. 94, 451 - 464 (1979)
- Hanson, D.K., Miller, D.H., Mahler, H.R., Alexander, N.J., Perlman, P.S.: Regulatory interactions between mitochondrial genes II. Detailed characterization of novel mutants mapping within one cluster in the COB 2 region
J. Biol. Chem. 254, 2480 - 2490 (1979)
- Hedgpeth, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W.: DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3348 - 3452 (1972)
- Heyting, C., Sanders, J.P.M.: The physical mapping of some genetic markers in the 21 S ribosomal region of the mitochondrial DNA in yeast
In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Amsterdam: North-Holland pp. 273 - 281 (1976)
- Heyting, C., Talen, J.C., Weijers, P.J., Borst, P.: Fine structure of the 21 S ribosomal RNA region on yeast mitochondrial DNA

- II. The organization of sequences in petites mitochondrial DNA's carrying genetic markers from the 21 S region
Molec. gen. Genet. 168, 251 - 277 (1979a)
- Heyting, C., Menke, H.H.: Fine structure map of the 21 S ribosomal RNA region on yeast mitochondrial DNA III. Physical location of mitochondrial genetic markers and the molecular nature of Δ
Molec. gen. Genet. 168, 279 - 291 (1979b)
- Jackson, E.N., Miller, H.J., Adams, M.C.: EcoRI restriction endonuclease cleavage site map of bacteriophage P22 DNA
J. Mol. Biol. 118, 347 - 363 (1978)
- Katan, M.B., van Harten-Loosbroek, N., Groot, G.S.P.: The cytochrome bc₁ complex of yeast mitochondria. Sites of translation of the polypeptides in vivo
Eur. J. Biochem. 70, 409 - 417 (1976)
- Kelly, R.B., Cozzarelli, N.R., Deutscher, M.P., Lehmann, I.R., Kornberg, A.: Enzymatic synthesis of deoxy-ribonucleic acid
J. Biol. Chem. 245, 39 - 45 (1970)
- Kotylak, Z., Slonimski, P.P.: Joint control of cytochrome a and b by a unique mitochondrial DNA region comprising four genetic loci
In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Amsterdam: North Holland pp. 143 - 154 (1976)
- Kotylak, Z., Slonimski, P.P.: Mitochondrial mutants isolated by a new screening method based upon the use of the nuclear mutation op1

- In: 'Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 83 - 90 (1977a)
- Kotylak, Z., Slonimski, P.P.: Fine structure genetic map of the mitochondrial DNA region controlling coenzyme QH₂:cytochrome c reductase
- In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 161 - 172 (1977b)
- Kováč, L., Groot, G.S.P., Racker, E.: Translocation of protons and potassium ions across the mitochondrial membrane of respiring and respiration-deficient yeasts
Biochim. Biophys. Acta 256, 55 - 65 (1972)
- Kováčová, V., Irmmlerová, J., Kováč, L.: Oxydative phosphorylation in yeast IV. Combination of a nuclear mutation to respiratory deficiency
Biochim. Biophys. Acta 162, 157 - 163 (1968)
- Kreike, J., Bechmann, H., van Hemmert, F.J., Schweyen, R.J., Boer, P.H., Kaudewitz, F., Groot, G.S.P.: The identification of apocytochrome b as a mitochondrial gene product and immunological evidence for altered apocytochrome b in yeast strains having mutations in the COB region of mitochondrial DNA
Eur. J. Biochem. (1979) im Druck
- Landy, A., Ruedisueli, E., Robinson, L., Foeller, C., Ross, W.: Digestion of deoxyribonucleic acid from bacteriophage T7, lambda and Ø 80h with site specific nucleases from Haemophilus influenzae strain Rc and Rd

Biochemistry 13, 2134 - 2142 (1974)

Lang, B., Burger, G., Bandlow, W., Kaudewitz, F., Schweyen, R.J.: Antimycin and funiculosin-resistant mutants in *Saccharomyces cerevisiae*: New markers on the mitochondrial DNA

In: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, T., Neupert, W., Sebald, W., Werner, S., eds.) Amsterdam: North Holland pp. 461 - 466 (1976)

Lang, B., Burger, G., Doxiadis, I., Thomas, D.Y., Bandlow, W., Kaudewitz, F.: A simple method for the large scale preparation of mitochondria from microorganisms
Anal. Biochem. 77, 110 - 121 (1977)

Lehrach, H., Diamond, D., Worney, J.M., Boedtke, H.: RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination

Biochemistry 16, 4743 - 4751 (1977)

Lewin, A., Morimoto, R., Merten, S., Martin, N., Berg, P., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M.: Physical mapping of mitochondrial genes and transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*

In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 271 - 290 (1977)

Locker, J., Rabinowitz, M., Getz, G.S.: Tandem inverted repeats in mitochondrial DNA of petite mutants of *S. cerevisiae*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1366 - 1370 (1974a)

- Locker, J., Rabinowitz, M., Getz, G.S.: Electron microscopic and renaturation kinetic analysis of mitochondrial DNA of cytoplasmic petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*
J. Mol. Biol. 88, 489 - 507 (1974b)
- Locker, J., Morimoto, R.S., Rabinowitz, M.: Analysis of mitochondrial RNA in *Saccharomyces cerevisiae*
Current Genetics, im Druck
- Mason, T.L., Schatz, G.: Cytochrom c oxidase from bakers yeast. II. Site of translation of the protein components
J. Biol. Chem. 248, 1355 - 1360 (1973)
- Mahler, H.R., Hanson, D., Miller, D., Bilinski, T., Ellis, D.M., Alexander, W.J., Perlman, P.S.: Structural and regulatory mutations affecting mitochondrial gene products
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaude-witz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 345 - 370 (1977)
- Mahler, H.R.: Mit⁻ mutants with lesions affecting complex III of the respiration chain
In: 9th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Rochester, pp. 10 (1978)
- Morimoto, R., Lewin, A., Hsu, H.J., Rabinowitz, M., Fukuhara, H.: Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from grande and genetically characterised cytoplasmic petite clones of *Saccharomyces cerevisiae*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3868 - 3872 (1975)

Morimoto, R., Lewin, A., Merten, S., Rabinowitz, M.:

Restriction endonuclease mapping and analysis of grande and mutant yeast mitochondrial DNA

In: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, T., Neupert, W., Sebald, W., Werner, S., eds.) Amsterdam: North Holland pp. 519 - 525 (1976)

Morimoto, R., Lewin, A., Rabinowitz, M.: Physical mapping and characterization of the mitochondrial DNA and RNA sequences from mit⁻ mutants defective in cytochrome oxidase peptide 1 (Oxi 3)

Molec. gen. Genet. 170, 1 - 9 (1979)

Müller, W., Gautier, F.: Interactions of heterochromatic compounds with nucleic acids AT-specific non intercalating DNA ligands

Eur. J. Biochem. 54, 385 - 394 (1975)

Nagley, P., Sriprakash, K.S., Rytka, J., Choo, K.B., Trembath, M.K., Lukins, H.B., Linnane, A.W.: Physical mapping of genetic markers in the yeast mitochondrial genome

In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Amsterdam: North Holland pp. 231 - 243 (1976)

van Ommen, G.J.B., Groot, G.S.P.: A transcription map of yeast mitochondrial DNA

In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaude-witz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 415 - 424 (1977)

- van Ommen, G.J.B., Groot, G.S.P., Grivell, L.A.: Transcription maps of the mitochondrial DNA's of two strains of *Saccharomyces*: Evidence for transcription of strain specific insertions and complex RNA maturation including splicing
Cell (1979) im Druck
- Pajot, P., Wambier-Kluppel, M.L., Slonimski, P.P.: Cytochrome c reductase and cytochrome oxidase formation in mutants and revertants in the "box" region of the mitochondrial DNA
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 173 - 184 (1977)
- Peacock, A.C., Dingman, C.W.: Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamid gel electrophoresis
Biochemistry 6, 1818 - 1827 (1967)
- Pinder, J.C., Staynov, D.Z., Gratzner, W.B.: Electrophoresis of RNA in formamid
Biochemistry 13, 5373 - 5378 (1974)
- Prunell, A., Bernardi, G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells VI. Genome organization
J. Mol. Biol. 110, 53 - 74 (1977)
- Rigby, P.W., Dieckman, M., Rhodes, C., Berg, P.: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I
J. Mol. Biol. 113, 237 - 251 (1977)

- Roberts, R.J., Myers, P.A., Morrison, A., Murray, K.: A specific endonuclease from *Arthrobacter luteus*
J. Mol. Biol. 102, 157 - 165 (1976)
- Sanders, J.P.M., Flavell, R.A., Borst, P., Mol, J.N.M.: Nature of the base sequence conserved in the mitochondrial DNA of a low density petite
Biochim. Biophys. Acta 312, 441 - 457 (1973)
- Sanders, J.P.M., Heyting, C., Di Franco, A., Borst, P., Slonimski, P.P.: The organization of genes in yeast mitochondrial DNA
In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Amsterdam: North Holland pp. 259 - 272 (1976)
- Sanders, J.P.M., Heyting, C., Verbeet, M.P.H., Meijlink, F.C.P.W., Borst, P.: The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. III Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNA's from three wild-type *Saccharomyces* strains
Molec. gen. Genet. 157, 239 - 261 (1977)
- Sanger, F., Coulson, A.R., Friedmann, T., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Fiddes, I.C., Hutchison III, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M.J.: The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174
J. Mol. Biol. 125, 225 - 246 (1978)
- Schatz, G., Mason, T.L.: The biosynthesis of mitochondrial proteins
Annu. Rev. Biochem. 43, 51 - 87 (1974)

Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B., Kaude-
witz, F.: Localization of seven gene loci on a circular
map of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cere-*
visiae

In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Sac-
cone, C., Kroon, A.M., eds.) Amsterdam: North Hol-
land pp. 251 - 259 (1976)

Schweyen R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B., Kaude-
witz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome
including the fine structure of COB and Oxi clusters
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mito-
chondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaude-
witz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 139 - 149 (1977)

Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B., Kaude-
witz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome
in yeast. Map positions of drug^r and mit⁻ markers as
revealed from population analysis of rho⁻ clones in
Saccharomyces cerevisiae

Molec. gen. Genet. 159, 151 - 160 (1978)

Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J.: Detection of two
restriction endonuclease activities in *Haemophilus*
parainfluenzae using analytical agarose ethidium
bromide electrophoresis

Biochemistry 12, 3055 - 3063 (1973)

Slonimski, P.P., Tzagoloff, A.: Localization in yeast
mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency
of cytochrom-oxidase and/or coenzyme QH₂-cytochrome-c-
reductase

Eur. J. Biochem. 61, 27 - 41 (1976)

- Slonimski, P.P., Pajot, P., Jacq, C., Foucher, M., Perro-
rodin, G., Kochko, A., Lamouroux, A.: Mosaic organization
and expression of the mitochondrial DNA region control-
ling cytochrom c reductase and oxidase. I. Genetic,
physical and complementation maps of the box region
In: Biochemistry and Genetics of Yeast: Pure and Applied
Aspects (Bacila, M., Horecker, B.L., Stoppani, A.O.M.,
eds.) New York: Academic Press pp. 339 - 368 (1978a)
- Slonimski, P.P., Claisse, M.L., Foucher, M., Jacq, C.,
Kochko, A., Lamouroux, A., Pajot, P., Perrodin, G.,
Spyridakis, A., Wambier-Kluppel, M.L.: Mosaic organi-
zation and expression of the mitochondrial DNA region
controlling cytochrome c reductase and oxidase. III.
A model of structure and function
In: Biochemistry and Genetics of Yeast: Pure and Applied
Aspects (Bacila, M., Horecker, B.L., Stoppani, A.O.M.,
eds.) New York: Academic Press pp. 391 - 401 (1978b)
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among
DNA fragments separated by gel electrophoresis
J. Mol. Biol. 98, 503 - 517 (1975)
- Sriprakash, K.S., Molloy, P.L., Nagley, P., Lukins, H.B.,
Linnane, A.W.: Biogenesis of mitochondria XLI. Physical
mapping of mitochondrial genetic markers in yeast
J. Mol. Biol. 104, 485 - 503 (1976)
- Tanaka, T., Weisblumm, B.: Construction of a colicin E1-
R-factor composite plasmid in vitro: Means for ampli-
fication of deoxyribonucleic acid
J. Bacter. 121, 354 - 362 (1975)

- Thuring, R.W.J., Sanders, J.P.M., Borst, P.: A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels
Anal. Biochemistry 66, 213 - 220 (1975)
- Tzagoloff, A., Rubin, M.S., Sierra, M.F.: Biosynthesis of mitochondrial enzymes
Biochim. Biophys. Acta 301, 71 - 104 (1973)
- Tzagoloff, A., Akai, A., Needleman, R.B.: Assembly of the mitochondrial membrane system. Isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific defects in mitochondrial functions
J. Bacter. 122, 826 - 831 (1975)
- Tzagoloff, A., Foury, F., Akai, A.: Resolution of the mitochondrial genome
In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Amsterdam: North Holland pp. 155 - 163 (1976a)
- Tzagoloff, A., Foury, F., Akai, A.: Genetic determination of mitochondrial cytochrome b
In: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, T., Neupert, W., Sebald, W., Werner, S., eds.) Amsterdam: North Holland pp. 419 - 426 (1976b)
- Wachter, E., Sebald, W., Tzagoloff, A.: Altered amino acid sequence of the DCCD-binding protein in the Oli 1 resistant mutant D273-10b / A21 of *Saccharomyces cerevisiae*
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaude-witz, F., eds.) Berlin: de Gruyter pp. 441 - 450 (1977)

Wolf, K., Dujon, B., Slonimski, P.P.: Mitochondrial genetics. V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*
Molec. gen. Genet. 125, 53 - 90 (1973)

Z u s a m m e n f a s s u n g

- Für eine Hybridisierungskartierung des gesamten mitochondrialen Genoms der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine einfache gelelektrophoretische Methode verwendet,

die es erlaubte, viele, genetisch charakterisierte rho⁻ Mutanten gleichzeitig zu untersuchen. Damit konnte

1. die Länge der enthaltenen Wt-Sequenz des jeweiligen rho⁻ Stammes bestimmt werden.

2. den verwendeten genetischen Markern physische Abstände auf einer zirkulären Karte des mtGenoms zugeordnet werden.

- Restriktions- und Hybridisierungsanalysen der DNS von rho⁻ Mutanten, die den für Apocytochrom b (COB) codierenden Bereich des mtGenoms vollständig oder teilweise enthalten, führten zu

1. der Bestimmung der maximalen Länge dieser Region von 10.000 Bp und ihrer Zuordnung zu den Wt-Restriktionsfragmenten TT8, DT13 und TD7.

2. der Bestimmung der minimalen Länge von COB mit 7000 Bp und die Lokalisierung dieses Bereiches auf den Fragmenten TT5 und RR6.

- Mit dem Restriktionsenzym HpaII wurde eine Feinkarte der COB Region erstellt, die es erlaubte,

1. die codierenden Bereiche (Exons) innerhalb des COB Locus zu lokalisieren und ihre maximale Größe anzugeben:

α = 800 Bp; β = 400 Bp; γ = 425 Bp; δ = 125 Bp; ϵ = 500 Bp.

2. die minimalen Längen der dazwischenliegenden Sequenzen (Introns oder "intervening sequences") zu bestimmen:

$\alpha/\beta = 1920$ Bp; $\beta/\gamma = 1370$ Bp; $\gamma/\delta = 1320$ Bp; $\delta/\epsilon = 800$ Bp.

- Hybridisierungsanalysen von mtRNS mit Exon + Intron- oder nur Intronmaterial enthaltender rho⁻ DNS führten zur Identifizierung

1. einer 18 S RNS, die wahrscheinlich den COB Messenger repräsentiert.

2. mehrerer hochmolekularer RNS Spezies (20, 24, 26 und 28 S), die "precursor" RNS darstellen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1976 bis Juni 1979 am Genetischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.F. Kaudewitz durchgeführt.

Am Ende dieser Arbeit möchte ich allen herzlich danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.F.Faudewitz für die Anregung und großzügige Förderung der Untersuchungen, Herrn Priv.Dozent Dr.R.J.Schweyen für die Bereitstellung der Mutanten und seine ständige Bereitschaft für zahlreiche Diskussionen, Herrn Dr.A.Haid, Herrn Dr. B.Lang und Herrn Dr. I.Doxiadis für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung biochemischer Arbeiten, außerdem Herrn Dr. A.Haid für die Überlassung der RNS-gelelektrophoretischen Daten und Herrn C.Schmelzer für die Bereitstellung einiger Restriktionsdaten.

Fräulein K.Watzinger möchte ich vor allem für die gewissenhafte Assistenz bei der Durchführung einiger Versuche danken, sowie für ihre Hilfe und der von Herrn Dr.I.Doxiadis bei der Fertigstellung des vorliegenden Manuskriptes.

Allen anderen Mitarbeitern des Institutes danke ich für nützliche Diskussionen.

Lebenslauf

geboren am: 17. Juni, 1950

in: Dortmund

Eltern: Karl-August Müller-Klönne und
Gerda Müller-Klönne, geb. Gündell

ohnort: 1950-1968 Bochum, Herderallee 3

Schulen: 1956-1960 Hagenschule, Volksschule, Bochum
1960-1968 Hildegardis-Gymnasium, Bochum
1968 Abitur in Bochum

Ausbildung: 1968-1970 Apothekerpraktikum in der
Dr. Wildi's Apotheke, Rottach-Egern
1970 Vorexamen in Pharmazie, München

Studium: 1970/71 Beginn des Studiums der Natur-
wissenschaften an der Universität, München
1971 Beginn des Studiums der Biologie
an der Universität München
1973 Vordiplom in Biologie, München
1974-1975 Diplomarbeit am Genetischen
Institut der Universität, München
1976 Diplom in Biologie, München
1976-1979 Dissertationsarbeit am Gene-
tischen Institut der Universität, München
unter Anleitung von Professor Kaudewitz

Eheschließung: 1974 mit Andreas Grosch

